

UNIVERSITE DE NANTES
U.F.R. d'ONTOLOGIE

Ecole Doctorale
BIOLOGIE-SANTE

Serena Lopez Cazaux

DIFFERENCIATION ODONTOBLASTIQUE : ROLE DU MILIEU ET DES
FACTEURS DE CROISSANCE

Soutenue le 30 Octobre 2009

Jury :

M. le Pr Jean-Christophe Farges : rapporteur

M. le Pr Michel Goldberg : rapporteur

M. le Pr Jérôme Guicheux : examinateur

M. Le Pr Louis-Frédéric Jacquelin : examinateur

M. le Pr Jean-Louis Morrier : examinateur

M. le Pr Pierre Weiss : examinateur

Mme le Pr Brigitte Alliot-Licht : directrice

Mme le Dr Sylvie Dajeau-Trutaud : co-directrice

LISTE DES ABREVIATIONS

- ADN : Acide désoxyribonucléique
ARN : Acide ribonucléique
ALP : Phosphatase alcaline (*Alcaline Phosphatase*)
- BMP : Protéine de morphogénèse osseuse (*Bone Morphogenetic Protein*)
BSP : Sialoprotéine osseuse (*Bone SialoProtein*)
- CCL : Chimiokine à motif CC
CMH : Complexe majeur d'histocompatibilité
CXCL : Chimiokine à motif CXC
- DC : Cellule dentritique (*Dendritic Cell*)
Dex : Dexaméthasone
DO : Densité Optique
DPP : Phosphoprotéine dentinaire (*Dentin PhosphoProtein*)
DSPP : Sialophosphoprotéine dentinaire (*Dentin SialoPhosphoProtein*)
DSP : Sialoprotéine dentinaire (*Dentin SialoProtein*)
DMP1: *Dentin matrix protein 1*
- GH: Hormone de croissance (*Growth Hormone*)
GHBP: *Growth hormone binding protein*
GHR: Récepteur de l'hormone de croissance (*Growth Hormone Receptor*)
GHRH: somatolibérine (*Growth Hormone Releasing Hormone*)
- HA: Hydroxy Apatite
IGF1: *Insuline Growth factor 1*
IR: Infra rouge
JAK: JAnus Kinase
- LTA : Acide lipotéichoïque
LPL : Lipoprotéine lipase
LPS : Lipopolysaccharide
LT : Lymphocyte T
- MAPK : Protéine kinase activée par la mitose (*Mitogen Activated Protein Kinase*)
MEM : *Minimum Essential Medium*
MEPE: *Matrix Extracellular Phosphoglycoprotein*
MMP : Métalloprotéinases matricielles (*Matrix MetalloProteases*)
- OC: Ostéocalcine
ON : Ostéonectine
OPN: Ostéopontine
- PBS: Tampon phosphate (*Phosphate Buffered Saline*)
Pit-1: *pituitary-specific transcription factor-1*
PTH: Hormone parathyroïde (*Parathyroïde Hormone*)
- RPMI: *Roswell Park Memorial Institute*

RT-PCR: *Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction*
SIBLING: *Small Intergrin-Binding LIgand N-linked Glycoproteins*
SMA: Actine du muscle lisse (*Smooth muscle actine*)
SRIF: Somatostatine (*Somatotropine Releasing-Inhibiting Factor*)
STAT: *Signal Transducers and Activators of Transcription*
SVF: Sérum de Veau Fétal

TGF β : Facteur de croissance transformant de type β (*Transforming Growth Factor β*)
TLR: Récepteur semblable à Toll (*Toll-Like Receptor*)

SOMMAIRE :

Introduction

I. Situation du sujet : Les cellules de la pulpe dentaire

- 1.1. Généralités
- 1.2. Les odontoblastes
 - 1.2.1. Origine et différenciation odontoblastique
 - 1.2.2. Facteurs impliqués dans la différenciation odontoblastique
 - a) Les TGF β
 - b) Les BMPs
 - c) GH et IGF1
 - 1.2.3. Organisation structurale
 - a) Le corps cellulaire
 - b) Le prolongement odontoblastique
 - c) Organisation en palissade
 - 1.2.4. Rôles des odontoblastes
 - a) Synthèse des dentines
 - b) Rôle de cellule immunitaire
 - c) Rôle de cellule neurosensorielle
- 1.3. Les cellules de Höhl
- 1.4. Les fibroblastes pulpaire
 - 1.4.1. Rôle de synthèse de la matrice extracellulaire pulpaire
 - 1.4.2. Rôle de cellule immunitaire
- 1.5. Les cellules souches
 - 1.5.1. Définition
 - 1.5.2. Identification et localisation dans la pulpe dentaire
 - 1.5.3. Cellules souches et réparation pulpo-dentinaire
 - 1.5.4. Cellules souches et ingénierie tissulaire
- 1.6. Les cellules de défense
 - 1.6.1. Les cellules dendritiques
 - 1.6.2. Les macrophages

II. Première partie expérimentale : cellules souches et modèle primaire de cellules pulpaire humaine

- 2.1. Généralités sur les cultures de cellules pulpaire
- 2.2. Matériel et méthodes
 - 2.2.1. Matériel
 - 2.2.2. Cultures cellulaires
 - 2.2.3. Etude de la prolifération cellulaire
 - a) Comptages cellulaires
 - b) Incorporation de thymidine tritiée
 - 2.2.4. Activité phosphatase alcaline
 - a) Mise en évidence de la Phosphatase alcaline par coloration
 - b) Mesure de l'activité phosphatase alcaline

- 2.2.5. Mise en évidence des cellules SMA+ et des cellules STRO-1+
 - a) SMA
 - b) STRO-1
- 2.2.6. Etude des marqueurs de différenciation odontoblastique
 - a) Extraction d'ARN
 - b) RT-PCR
- 2.2.7. Analyse statistique
- 2.3. Mise en évidence de l'effet des conditions de culture
 - 2.3.1. Intérêt de l'étude
 - 2.3.2. Résultats
 - 2.3.2.1. Effet du milieu de culture sur la morphologie cellulaire
 - a) Aspect cellulaire en primoculture
 - b) Mise en évidence des cellules SMA+
 - 2.3.2.2. Effet du milieu de culture sur la prolifération cellulaire
 - a) En Primoculture
 - b) Au cours des passages
 - 2.3.2.3. Effet du milieu de culture sur le pourcentage de cellules SMA+
 - 2.3.2.4. Effet du milieu de culture sur la minéralisation des nodules
 - 2.3.2.5. Effet du milieu de culture sur la différenciation cellulaire
- 2.4. Effet de la DEX sur le recrutement et la différenciation des cellules souches dans des cultures de cellules pulpaires cultivées en RPMI
 - 2.4.1. Intérêt de l'étude
 - 2.4.2. Résultats
 - 2.4.2.1. Effet de la Dex sur la prolifération cellulaire
 - 2.4.2.2. Effet de la Dex sur le pourcentage de cellules souches pulpaires
 - a) Les cellules SMA+
 - b) Les cellules souches STRO-1+
 - 2.4.2.3. Effet de la Dex sur la différenciation cellulaire
 - a) Phosphatase alcaline
 - b) Marqueurs de différenciation
- 2.5. Discussion et conclusions

III. Deuxième partie expérimentale : Effet de l'hormone de croissance sur une lignée d'odontoblastes : Les M2H4

- 3.1. Généralités sur l'hormone de croissance
 - 3.1.1. Synthèse, sécrétion et mécanisme d'action
 - 3.1.2. Rôles
 - 3.1.3. Pathologies associées à un trouble de sécrétion de la GH
 - a) Déficit
 - b) Excès
- 3.2. Intérêt de l'étude
- 3.3. Matériel et méthode
 - 3.3.1. Matériel
 - 3.3.2. Cultures cellulaires
 - 3.3.3. Prolifération cellulaire
 - 3.3.4. Western Blot
 - 3.3.5. Extraction d'ARN
 - 3.3.6. RT-PCR
 - 3.3.7. PCR quantitative en temps réel
 - 3.3.8. Analyse statistique
- 3.4. Résultats
 - 3.4.1. Expression du récepteur de la GH
 - 3.4.2. Effet de la GH sur la prolifération cellulaire

- 3.4.3. Etude de l'implication de la voie ERK1,2
- 3.4.4. Effet de la GH sur l'expression de marqueurs de différenciation odontoblastique
- 3.5. Discussion et conclusions

IV. Annexes : Publications en rapport avec la thèse

Références Bibliographiques

Introduction

La dent est une entité complexe constituée de trois tissus minéralisés : l'émail, la dentine et le cément ; et d'un tissu conjonctif : la pulpe dentaire.

La carie dentaire est une maladie multifactorielle d'origine bactérienne. Sa prévalence diminue mais l'OMS la définit encore comme le 4^{ème} fléau mondial après les cancers, les maladies cardiovasculaires et le SIDA. Après l'attaque de l'émail, la carie va mettre en péril le complexe dentino-pulpaire et l'intégrité dentaire. La pulpe dentaire peut se défendre par l'élaboration de dentine réactionnelle. Mais très vite, l'envahissement du tissu dentinaire et du tissu pulpaire par les pathogènes bactériens conduisent à une inflammation puis à une nécrose pulpaire qui vont entraîner la dévitalisation voir l'extraction de la dent.

La préservation des tissus minéralisés et de la vitalité pulpaire et l'un des fondements de notre activité de clinicien. Pour cela le développement de nouvelles thérapeutiques pour préserver la vitalité pulpaire (donc l'organe dentaire) mais également l'élaboration de nouvelles dents par ingénierie cellulaire/tissulaire sont nécessaires et constituent un véritable défi pour les chercheurs.

Le tissu pulpaire dentaire est constitué de différentes populations cellulaires et d'une matrice extracellulaire riche en molécules inductrices. Sa physiopathologie complexe et unique n'est pas encore complètement élucidée (chapitre I).

De nombreuses équipes de recherches travaillent sur les différents aspects de la biologie pulpaire et odontoblastique. Dans ce travail nous nous sommes focalisés sur deux aspects de la physiologie pulpaire :

- les cellules souches pulpaires avec une étude des conditions de culture pouvant favoriser le recrutement des précurseurs d'intérêt dans l'optique d'une application en ingénierie tissulaire (chapitre II),
- l'effet d'un facteur de croissance : l'hormone de croissance sur les odontoblastes (chapitre III).

I. Situation du sujet

Les cellules de la pulpe dentaire

Dans le cadre de cette thèse d'Université, nous avons mis en culture des cellules de la pulpe dentaire afin d'étudier les effets du milieu de culture et de l'hormone de croissance. Dans ce chapitre nous allons décrire les cellules du tissu pulpaire pour permettre de comprendre les spécificités des cellules sur lesquelles nous avons travaillé.

1.1. Généralités

La pulpe dentaire est un tissu conjonctif lâche hautement spécialisé logé dans la cavité pulpaire au centre de la dent.

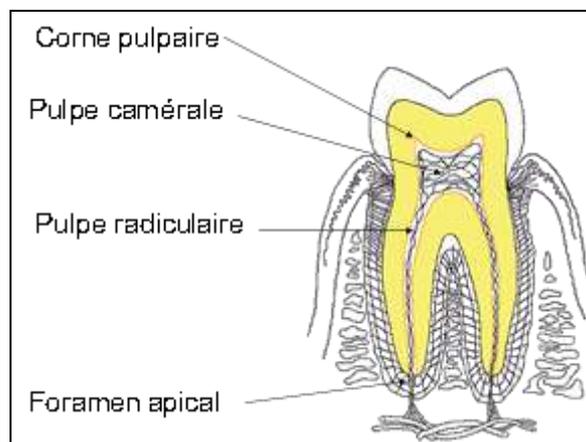


Figure 1.1 : Représentation schématique de la pulpe dentaire

Il faut distinguer :

- la pulpe camérale logée dans la chambre pulpaire et comprenant les cornes pulpaires,
- la pulpe radiculaire logée dans les canaux radiculaires et qui est en relation avec l'extérieur par le foramen apical.

D'un point de vue embryonnaire, la pulpe dérive du mésenchyme para-axial provenant du premier arc branchial. La pulpe succède à la papille ectomésenchymateuse (mésenchyme contenant des cellules des crêtes neurales ayant migrés du mésencéphale et du rhombencéphale antérieur) du germe dentaire à la fin du stade de la cloche (Piette et Goldberg, 2001).

Histologiquement, le tissu pulpaire constitué de cellules dispersées dans une matrice de manière non uniforme, présente quatre zones distinctes (Nanci, 2007, 1998 ; Piette et Goldberg, 2001). De la périphérie vers le centre sont décrites :

- la zone odontoblastique : les odontoblastes forment une couche cellulaire continue,
- la zone acellulaire de Weil : décrite de manière inconstante et surtout apparente au niveau des cornes pulpaires. Elle est située directement sous les odontoblastes (épaisseur d'environ 40 µm). Cette zone, dépourvue de cellules, est riche en capillaires sanguins (plexus capillaire sous odontoblastique) et en terminaisons nerveuses sensibles et autonomes (Plexus de Raschkow),
- la zone sous odontoblastique de Höhl : zone d'une faible épaisseur riche en cellules. Elle contient principalement les cellules de Höhl, des fibroblastes et des cellules dendritiques immatures,
- la zone centrale : tissus conjonctif lâche constitué de cellules (fibroblastes, cellules de défense) dans une matrice extracellulaire, d'un réseau de vaisseaux sanguins associés à leur système nerveux sympathique, de vaisseaux lymphatiques, de troncs nerveux sensitifs et des terminaisons nerveuses libres.

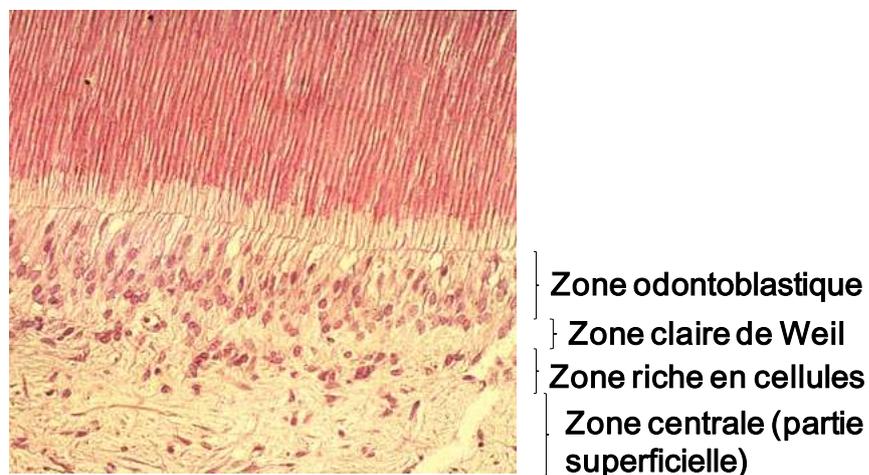


Figure 1.2 : Coupe histologique décalcifiée et colorée illustrant les différentes zones pulpaires (B. Alliot-Licht).

La pulpe a comme principale fonction la production des dentines et le maintien de la structure du tissu pulpaire mais elle a également un rôle neurosensoriel et immunitaire (Piette et Goldberg, 2001 ; Farges *et al*, 2009 ; Magloire *et al*, 2009). Ces fonctions sont assurées par

les différents composants de ce tissu : les différents types de cellules, la matrice extra cellulaire et les éléments vasculaires et nerveux.

Dans la suite de ce chapitre nous nous focaliserons sur les différents types cellulaires présents dans la pulpe dentaire.

1.2. Les odontoblastes

1.2.1. Origine et différenciation odontoblastique

Les odontoblastes sont des cellules hautement spécialisées dérivant des crêtes neurales.

La différenciation odontoblastique résulte d'interactions épithélio-mésenchymateuses entre des cellules compétentes de la papille dentaire (cellules des crêtes neurales) et l'épithélium dentaire interne au travers de la membrane basale. On parle de différenciation odontoblastique en réponse à un signal épigénétique (Lesot *et al*, 2001). La différenciation est initiée en regard de chaque cuspide, s'étend en direction apicale et s'effectue selon un schéma temporospatial spécifique (Ruch *et al*, 1995).

La différenciation terminale des odontoblastes résulte d'une cascade d'évènements. Le préodontoblaste situé à proximité de la membrane a effectué un nombre déterminé de mitoses puis sort du cycle cellulaire. Lors de la dernière division le fuseau mitotique va s'orienter perpendiculairement à la membrane basale. Seules les cellules filles situées au contact de la membrane basale vont se polariser et ainsi se différencier en odontoblaste. Les cellules filles plus internes, donc à distance de la membrane basale, constituent les cellules de Höhl situées dans la zone sous odontoblastique (Goldberg et Smith, 2004).

L'odontoblaste se polarise, s'allonge. Le noyau passe en position basale et les organites de synthèse se développent en position supra basale. L'odontoblaste faiblement différencié secrète la dentine ou manteau dentinaire. Les éléments du cytosquelette (microfilaments et microtubules) se réorganisent et permettent l'allongement cellulaire et l'apparition de prolongements odontoblastiques (2 à 4) dans le manteau dentinaire (portion externe de la dentine, au contact de l'émail au niveau de la couronne et du ciment au niveau de la racine). Puis, l'odontoblaste se différencie totalement avec un prolongement

odontoblastique qui s'allonge. Il sécrète alors la prédentine et participe à sa minéralisation en dentine.

Le maintien du phénotype odontoblastique résulte des interactions entre l'odontoblaste et la matrice extracellulaire qu'il sécrète (Smith *et al*, 2001).

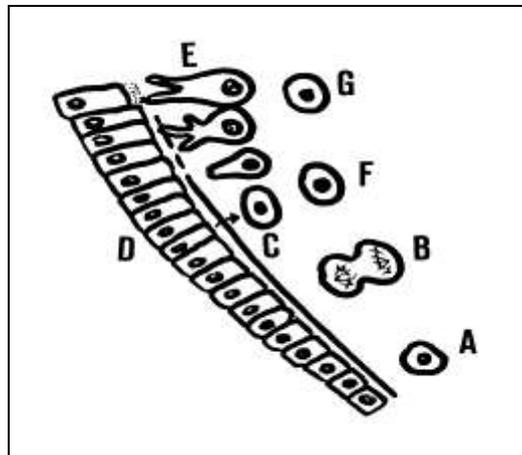


Figure 1.3 : Représentation schématique de la différenciation odontoblastique . A : préodontoblaste. B : dernière division cellulaire. C : odontoblaste présecréteur faiblement différencié. D : épithélium dentaire interne. E : odontoblaste sécréteur. F et G : cellules de Höhl (B. Alliot-Licht).

1.2.2. Facteurs impliqués dans la différenciation odontoblastique

La différenciation odontoblastique est régulée par des interactions épithélio-mésenchymateuses. L'épithélium dentaire interne contrôle la différenciation terminale des odontoblastes par l'intermédiaire de la membrane basale, qui par sa présence et des changements de sa composition joue un rôle clé dans ce phénomène (Lesot *et al*, 2001).

De plus des molécules de la matrice extracellulaire sont impliquées dans la différenciation terminale des odontoblastes. Des marquages immunohistochimiques et des hybridations *in situ* ont montrés la présence de facteurs de croissance et de leurs récepteurs lors de la différenciation odontoblastique. L'effet de ces molécules sur la différenciation

odontoblastique a été testé *in vitro*. Parmi ces facteurs sont retrouvés de manière non exhaustive : les TGF β (transforming growth factor β), les BMPs (bone morphogenetic protéines) et l'IGF1 (insuline growth factor 1) (Lesot *et al*, 2001).

a) Le TGF β

Le TGF β est une protéine ubiquitaire jouant un rôle important dans la régulation des processus cellulaires. Il est notamment impliqué dans la prolifération et la différenciation cellulaire, dans la synthèse de la matrice extra cellulaire, dans la réponse immunitaire et dans le processus de mort cellulaire (Prime *et al*, 2004). Les souris TGF β ^{-/-} présentent des anomalies dentaires (D'Souza et Litz, 1995) ce qui implique que les TGF β participent au développement dentaire.

Chez l'homme, 3 formes de TGF β sont décrites : TGF β 1, TGF β 2 et TGF β 3. Le TGF β 1 est exprimé par les préodontoblastes et par les odontoblastes polarisés et sécréteurs alors que son expression diminue dans les odontoblastes matures (Begue-Kirn *et al*, 1994). TGF β 1 est capable d'induire une différenciation odontoblastique sur des cultures isolées de papille dentaire (Begue-Kirn *et al*, 1994).

Les TGF β participent aux interactions épithélio-mésenchymateuses induisant la différenciation odontoblastique (Prime *et al*, 2004). Le TGF β 1 sécrété par l'épithélium dentaire interne est immobilisé et activé par les composants de la membrane basale puis interagissent avec les préodontoblaste et induit leur différenciation. L'odontoblaste se met ensuite à sécréter du TGF β 1 qui va agir de manière autocrine pour stimuler la sécrétion de prédentine et de dentine (Lesot *et al*, 2001).

b) Les BMPs

Les BMPs font partie de la superfamille des TGF β et sont impliquées dans le développement craniofacial et dentaire (Nie *et al*, 2006).

In vivo, l'étude du schéma d'expression de BMP-2, BMP-4 et BMP-7 montre que ces molécules sont exprimées par l'épithélium dentaire interne en face des cellules odontoblastiques (Vainio *et al*, 1993 ; Aberg *et al*, 1997) et indique qu'elles ont un rôle majeur dans les interactions épithélio-mésenchymateuses induisant la différenciation

odontoblastique (Nie *et al*, 2006). D'autre part, la BMP-4 est exprimé par les préodontoblastes et son expression diminue après leur différenciation en odontoblastes, alors que l'expression de la BMP-2 augmente pendant la différenciation odontoblastique terminale (Nie *et al*, 2006). BMP-2 et BMP-4 semblent donc impliquées dans la différenciation odontoblastique.

Des approches fonctionnelles *in vitro*, ont aussi montré que BMP-2 et BMP-4 sont capables d'induire la différenciation des odontoblastes (Begue-Kirn *et al*, 1992 ; Begue-Kirn *et al*, 1994).

c) L'IGF1 et la GH

L'IGF1 et la GH (growth hormone) semblent également impliqués dans la différenciation odontoblastique (Young *et al*, 1995 ; Werner et Katz, 2004). Des immunomarquages et des hybridations *in situ* réalisées chez le rat montrent en effet la présence de la GH et d'IGF1 et de leurs récepteurs au niveau des odontoblastes en cours de différenciation (Zhang *et al*, 1992a et 1997 ; Joseph *et al*, 1993 et 1996). La GH et IGF1 seraient donc impliqués dans la différenciation odontoblastique. D'autre part, des expériences *in vitro* ont montrés qu'IGF1 est capable d'induire la différenciation odontoblastique sur des cultures de papille dentaire de rat (Begue-Kirn *et al*, 1992).

Les mécanismes impliqués dans la différenciation odontoblastique sont très complexes. Des interactions et une synergie entre les différents facteurs impliqués doit exister *in vivo* et le rôle exact des facteurs de croissance reste encore à élucider (Unda *et al*, 2001).

1.2.3. Organisation structurale

L'odontoblaste est une cellule polarisée constituée d'un corps et d'un prolongement cellulaire.

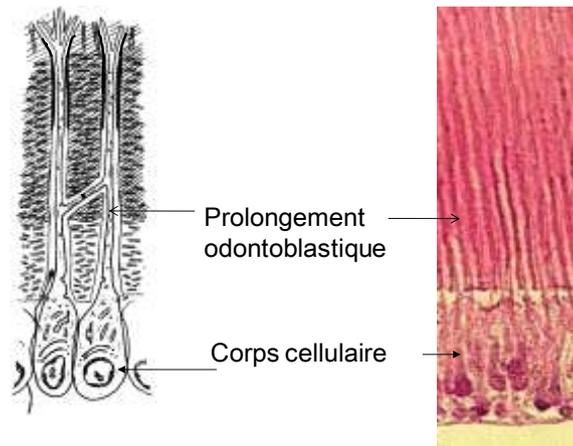


Figure 1.4 : ultrastructure d'un odontoblaste (B. Alliot-Licht).

a) **Le corps cellulaire**

Il est situé dans la pulpe. Sa longueur varie de 25 à 30 μm au niveau radiculaire et de 40 à 60 μm au niveau de la couronne ; sa largeur est d'environ 8 μm . Le noyau est situé en position basale de manière excentrée. Les organites de synthèse (réticulum endoplasmique, appareil de Golgi) et les mitochondries se situent en position supra nucléaire. On note également la présence d'un cil. (Piette et Goldberg, 2001 ; Arana-Chavez *et al*, 2004 ; Magloire *et al*, 2004).

b) **Le prolongement odontoblastique**

Le prolongement odontoblastique est logé dans les tubulis dentinaires et est entouré de fluide dentinaire. Son diamètre est de 0,5 à 1 μm et sa longueur est sujette à discussion. Certains pensent qu'il occupe toute la longueur du tubuli dentinaire jusqu'à la jonction émail-dentine. D'autres suggèrent que l'odontoblaste se rétracte au fur et à mesure de la synthèse de dentine et que le prolongement n'occupe que la partie interne du tubuli.

Le prolongement odontoblastique ne contient pas d'organites de synthèse mais son cytosquelette est très développé. Il contient des microtubules associés à des vésicules de sécrétions et de nombreux microfilaments d'actines et des filaments intermédiaires de

vimentine. Ces éléments sont disposés dans le sens longitudinal (Piette et Goldberg, 2001 ; Arana-Chavez *et al*, 2004 ; Goldberg *et al*, 2004 ; Magloire *et al*, 2004).

c) Organisation en palissade

Les odontoblastes sont situés en périphérie de la pulpe et s'organisent en palissade avec un système de jonction et de terminal web très développé, conférant aux odontoblastes un aspect de couche cellulaire de type épithéliale (Magloire *et al*, 2004).

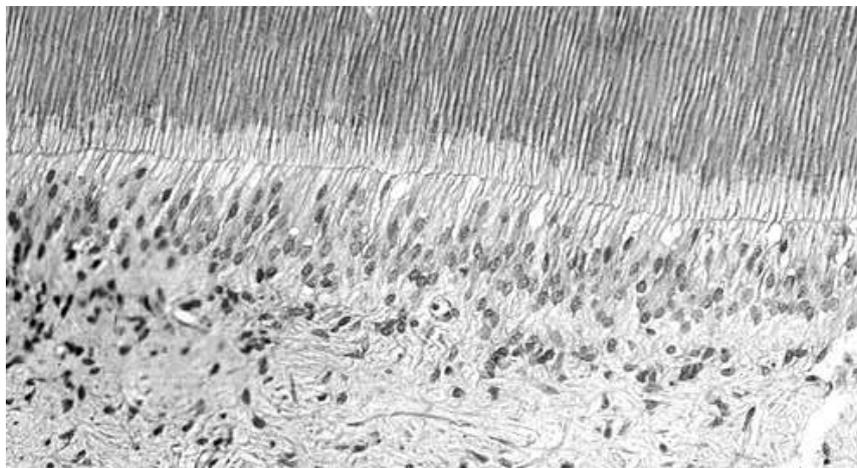


Figure 1.5 : Coupe histologique illustrant l'organisation des odontoblaste (B. Alliot-Licht).

Les trois types majeurs de jonctions intercellulaires sont retrouvés au niveau des odontoblastes (Nanci, 2007).

Des desmosomes sont situés à la base du prolongement cellulaire ce qui assure une forte cohésion mécanique entre les cellules (Kagayama *et al*, 1995). Des jonctions communicantes (gap junctions) sont situées le long des surfaces latérales et dans la partie basale des corps cellulaires. Elles permettent le passage d'ions et de molécules entre les odontoblastes et entre les odontoblastes et les cellules de la couche sous odontoblastique (Sasaki *et al*, 1982).

Les tight junctions situées entre les odontoblastes établissent une barrière entre les cellules (João *et al*, 2004) mais participent surtout à la polarisation et à la différenciation cellulaire (Arana-Chavez *et al*, 1997 et 2004 ; João *et al*, 2004).

1.2.4. Rôles des Odontoblastes

a) Synthèse des dentines

Les odontoblastes sont responsables de la synthèse, de la maturation et de la minéralisation de la dentine primaire, secondaire et tertiaire réactionnelle. C'est la principale fonction des odontoblastes.

Les odontoblastes vont sécrétés les éléments de la dentine selon deux sites de sécrétion.

A la jonction entre le corps cellulaire et le prolongement odontoblastique, il y a sécrétion de pré-dentine non minéralisée, constituée de collagène de type I et de protéoglycanes.

Au niveau du prolongement odontoblastique, au niveau du front de minéralisation : il y a sécrétion de la métadentine (qui est donc située entre la pré-dentine et la dentine) qui contient des SIBLINGs (Small Intergrin-Binding LIgand N-linked Glycoproteins) regroupant la dentine matrix protein 1 (DMP1), la bone sialoprotéine de type II (BSP II = BSP), l'ostéopontine (OPN, appelée aussi BSP I), la sialoprotéine dentinaire (DSP) et la phosphoprotéine dentinaire (DPP) (DSP et DPP sont issues d'un même gène, DSPP), la phosphoglycoprotéine matricielle extracellulaire (MEPE), et l'énaméline (Fisher *et al*, 2001 ; Fisher et Fedarko, 2003). L'odontoblaste sécrète également des protéines non phosphorylées comme l'ostéocalcine (ou Gla-protéine), l'ostéonectine (ou SPARC protéine), des protéoglycanes et des enzymes (les métalloprotéinases).

Les SIBLINGs jouent un rôle clé dans l'établissement de conditions favorables pour le dépôt de cristaux d'hydroxy-apatite (Arana Chavez *et al*, 2004). Elles initieraient et contrôleraient la minéralisation et la croissance des cristaux (Hao *et al*, 2004 ; Qin *et al*, 2004). Des mutations au niveau de leur gène entraînent des phénotypes dentaires avec des anomalies de minéralisation (Qin *et al*, 2004).

Le rôle exact de chaque molécule dans le processus de minéralisation de la pré-dentine en dentine n'est pas encore complètement élucidé mais les résultats de plusieurs équipes de recherche nous donnent des éléments de compréhension de ce phénomène complexe et montrent aussi que ces protéines peuvent être impliquées dans la différenciation odontoblastique.

Dans les paragraphes suivants, nous allons détailler les données récentes de la littérature concernant les SIBLINGs.

La DMP1 (dentine matrix protein 1) a longtemps été considérée comme une protéine spécifique de la dentine. Mais il est maintenant acquis qu'elle est également présente dans d'autres tissus : le ciment, le tissu osseux, le cerveau, le foie, le pancréas, le rein et les glandes salivaires (Hirst *et al*, 1997 ; Mac Dougall *et al*, 1998b ; Huq *et al*, 2005 ; Qin *et al*, 2007).

La DMP1 est exprimée par les cellules pulpaires et les odontoblastes (Feng *et al*, 2003). Elle est sécrétée de façon importante par les odontoblastes en voie de polarisation et les odontoblastes sécréteurs, mais elle est faiblement exprimée par les odontoblastes matures (Hao *et al*, 2004).

Dans la matrice dentinaire deux fragments correspondant à la partie N-terminale (37-kDa) et à la partie C-terminale (57-kDa) de la DMP1 ont été mis en évidence (Qin *et al*, 2003) alors qu'on ne retrouve qu'une faible quantité de DMP1 (totale) (Huang *et al*, 2008). La DMP1 serait donc un précurseur clivé en deux fragments qui sont les formes fonctionnelles (Qin *et al*, 2003 ; Qin *et al*, 2007).

DMP1 induit la formation d'hydroxyapatite et contrôle la différenciation cellulaire *in vitro* et contrôle la dentinogenèse *in vivo* (pour revue voir Qin *et al*, 2007).

L'étude des souris KO DMP1 apporte des éléments sur le rôle clé de DMP1 dans la minéralisation dentinaire et la différenciation odontoblastique. Une première étude a montré que les souris DMP1^{-/-} présentaient une pré-dentine plus large, une épaisseur de dentine plus fine ainsi que des chambres pulpaires plus volumineuses par rapport aux souris sauvages (Ye *et al*, 2004). Une deuxième étude plus récente a mis en évidence que les souris DMP1^{-/-} présentaient une hypominéralisation dentinaire et une diminution de l'expression de DSPP et d'ostérix (facteur de transcription important dans l'odontogenèse) (Lu *et al*, 2007). L'étude de Lu (2007) montre aussi que DMP1 joue un rôle important dans la formation et le maintien de la structure des tubulis dentinaires permettant ainsi le passage des ions calcium et phosphate vers le front de minéralisation et la métadentine pour permettre la minéralisation dentinaire. En effet les souris KO pour DMP1 présentent des perturbations du réseau tubulaire conduisant à une hypominéralisation dentinaire (Lu *et al*, 2007).

DMP1 agirait donc à différents niveaux. Il a un rôle initiateur de la minéralisation de la dentine en induisant la nucléation des cristaux aux stades précoces de la formation de la dentine (Hao *et al*, 2004). DMP1 a également un rôle de facteur de transcription (Narayanan *et al*, 2006) : au début de la différenciation odontoblastique, DMP1 est localisée au niveau du nucléole et est capable de se lier au promoteur de DSPP pour activer sa transcription

(Narayanan *et al*, 2006) expliquant ainsi la diminution de l'expression de DSPP et d'ostéonectine observé par Lu et coll sur les souris KO DMP1.

Le gène **DSPP (Dentin sialophosphoprotéine)** est fortement exprimé par les odontoblastes et transitoirement exprimé par les améloblastes. De faibles niveaux d'expression de DSPP ont également été retrouvés dans l'os, le rein, les poumons, les glandes salivaires et sudoripares (Qin *et al*, 2002 ; Suzuki *et al*, 2009).

DSPP a un rôle important dans la différenciation odontoblastique et dans la minéralisation dentinaire (D'Souza *et al*, 1997 ; Chen *et al*, 2005). Des mutations du gène DSPP ont été décrites chez des patients atteints de dentinogenèse imparfaite et de dysplasie dentinaire, deux anomalies de structure dentinaire majeures (Kim et Simmer, 2007). Les souris invalidées pour DSPP présentent les mêmes défauts dentinaires que les patients atteints de dentinogenèse imparfaite et de dysplasie dentinaire avec une prédentine plus large, un front de minéralisation irrégulier, une dentine hypominéralisée et de fréquentes expositions pulpaire (Sreenath *et al*, 2003).

DSPP donne naissance à deux protéines, la dentine phosphoprotéine (DPP ou phosphophoryne) et la dentine sialoprotéine (DSP). Ces deux protéines ont un rôle distinct dans la minéralisation dentinaire. L'étude du phénotype dentaire de souris invalidées pour DPP mais exprimant DSP montre une épaisseur de prédentine normale, une absence de zones hypominéralisées dans la dentine et des expositions pulpaire moins fréquentes par rapport aux souris invalidées pour DSPP (Suzuki *et al*, 2009). Les auteurs concluent que DSP est impliqué dans l'initiation de la minéralisation dentinaire alors que DPP joue un rôle dans la maturation dentinaire (Suzuki *et al*, 2009).

La BSP (bone sialoprotéine) est retrouvée dans la dentine, dans l'os, dans le ciment, dans les glandes salivaires et est également synthétisé par les cellules chondrocytaires et les trophoblastes placentaires (Qin *et al*, 2004 ; Butler et Ritchie, 1995 ; Huq *et al*, 2005). Son rôle exact dans la minéralisation est encore mal défini. BSP serait un initiateur de la formation des cristaux d'hydroxyapatite puis agirait comme un inhibiteur de la croissance de ces cristaux (Qin *et al*, 2004).

OPN (ostéopontine) est synthétisée par les odontoblastes, les préostéoblastes, les ostéocytes et les chondrocytes (Butler et Ritchie, 1995) mais est également retrouvée dans des tissus non minéralisés comme les glandes salivaires (Huq *et al*, 2005). OPN agirait comme un inhibiteur

de la minéralisation en diminuant la formation et la croissance des cristaux d'hydroxyapatite (Qui *et al*, 2004).

La MEPE (Matrix extracellular phosphoglycoprotein) est exprimée principalement dans la dentine et dans le tissu osseux (Huq *et al*, 2005). Dans le tissu osseux, MEPE est impliquée dans l'initiation de la minéralisation et le peptide ASARM (fragment C terminal de MEPE) est un inhibiteur de la minéralisation (Rowe *et al*, 2004). MEPE joue un rôle précoce dans la différenciation odontoblastique des cellules souches pulpaires et serait un inhibiteur de la minéralisation dentinaire. (Liu *et al*, 2005).

Les molécules de la matrice extracellulaire dentinaire jouent donc plusieurs rôles (Goldberg *et al*, 2009):

- Elles sont des protéines structurales formant un réseau tridimensionnel,
- Elles sont impliquées dans l'adhésion, la migration, la prolifération, la survie et la différenciation cellulaire, en participant aux interactions entre les cellules et la matrice extracellulaire,
- Elles jouent un rôle dynamique comme élément des voies de signalisation. Après interaction avec des récepteurs membranaires, elles sont internalisées dans la cellule, sont transloquées dans le nucléus et peuvent activer des voies de signalisation.

b) Rôle de cellule immunitaire

Parallèlement à son rôle de synthèse de la dentine, l'odontoblaste participe à la réponse immunitaire innée (Farges *et al*, 2009).

Les odontoblastes sont les premières cellules que rencontrent les bactéries responsables de l'attaque carieuse ; ils constituent donc la première ligne de défense (Durand *et al*, 2006; Farges *et al*, 2009). Des études récentes, *in vitro*, ont montrées que les odontoblastes humains expriment des membres de la famille des Toll-Like Receptor : TLR1-6 et TLR9 (Durand *et al*, 2006 ; Veerayutthwilai *et al*, 2007). Les TLRs sont impliqués dans la reconnaissance de molécules d'origine bactérienne, virale, fongique et parasitaire (Staquet *et al*, 2008). Par exemple TLR2 détecte le LTA (acide lipotéichoïque) qui est un constituant de la paroi bactérienne des bactéries GRAM+.

In vitro, les odontoblastes cultivés en présence de LTA vont surexprimer TLR2, 3, 5 et 9 et synthétiser différentes chimiokines dont CCL2 et CXCL10 (Durand *et al*, 2006). CCL2 intervient dans le recrutement et l'activation des cellules dendritiques immatures qui vont migrer de la zone centrale de la pulpe vers la périphérie et s'accumuler dans la zone odontoblastique alors que CXCL10 est responsable de la migration des lymphocytes T.

De plus, les odontoblastes expriment la bêta-défensine-2 (BD-2) qui est impliquée dans le recrutement des cellules dendritiques immatures, des cellules Natural Killer et des lymphocytes T CD4+ (Shiba *et al*, 2003).

Il faut également noter que les odontoblastes en culture en réponse au LTA vont diminuer l'expression de TGF β et de DSPP (Durand *et al*, 2006). En réponse à une attaque bactérienne, les odontoblastes diminueraient donc leur activité de synthèse de dentine et participeraient à la mise en place de la réponse immunitaire.

Les odontoblastes ont donc un rôle dans le recrutement des cellules de défense en réponse à une agression bactérienne et jouent donc un rôle important dans la réponse immunitaire innée (Farges *et al*, 2009).

c) Rôle de cellule sensorielle

Depuis quelques années plusieurs éléments ont montré la capacité de l'odontoblaste à être une cellule mécano-sensible impliquée dans la transmission des stimuli et la transmission de l'information douloureuse (Magloire *et al*, 2009).

Comme nous l'avons décrit précédemment, les odontoblastes sont des cellules polarisées constituées d'un corps cellulaire et d'un prolongement odontoblastique qui est situé dans les canalicules pulpaire contenant le fluide dentinaire. Ils sont entourés par un réseau dense de fibres nerveuses sensorielles amyéliniques qui entourent le corps et le prolongement odontoblastiques (Ibuki *et al*, 1996).

La sémaphorine 7A, synthétisée par les odontoblastes serait responsable du guidage des fibres nerveuses permettant leur arrivée au contact des odontoblastes (Maurin *et al*, 2005). La réeline, glycoprotéine de la matrice extracellulaire synthétisée par l'odontoblaste serait impliquée dans l'adhésion entre les odontoblastes et les fibres nerveuses (Maurin *et al*, 2004). Les odontoblastes ont à leur surface des canaux sodiques voltages dépendants et sont des cellules excitables capables d'engendrer des potentiels d'actions (Allard *et al*, 2006). Les

odontoblastes sont donc capables de traduire les mouvements du fluide dentinaire en signaux électriques (Magloire *et al*, 2009).

Les canaux ioniques potassiques mécanosensibles (canaux TREK-1 et canaux potassiques calcium dépendants) situés sur la membrane odontoblastique (Allard *et al*, 2000 ; Magloire *et al*, 2003) ainsi que le cil primaire (Magloire *et al*, 2004) seraient impliqués dans la transduction du signal.

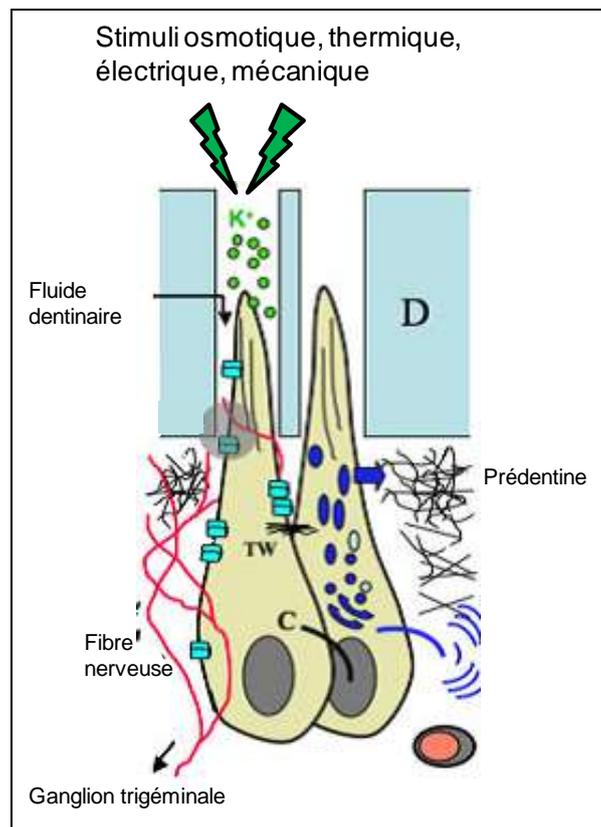


Figure 1.6 : Représentation schématique du rôle sensoriel de l'odontoblaste (modifié d'après Magloire *et al*, 2009).

Les odontoblastes sont donc des cellules primordiales dans la physiologie dentaire par leur rôle de synthèse de dentine et aussi par leur rôle de sentinelle sensorielle et immunitaire. Cependant ce sont des cellules très fragiles et surtout incapables de renouvellement car elles sont post-mitotiques. L'étude de leur comportement face à une agression *in vivo* ne peut se faire que chez l'animal. *In vitro*, l'étude des odontoblastes ne peut se faire que sur des lignées de cellules murines ou sur des cultures de cellules primaires (homme, porc, singe) à partir de cellules pulpaire dont on a induit la différenciation odontoblastique

1.3. Les cellules de Höhl

Les cellules de Höhl ont la même origine que les odontoblastes.

Lors de la dernière mitose des préodontoblastes, les cellules filles les plus internes donc situées à distance de la membrane basale (qui sépare les préaméloblastes et les préodontoblastes), ne se différencient pas en odontoblastes et retournent dans le cycle mitotique. Ces cellules sont appelées cellules de Höhl et sont situées dans la zone sous-odontoblastique riche en cellules (Goldberg *et al*, 2008) (Cf Fig. 1.2 et 1.3).

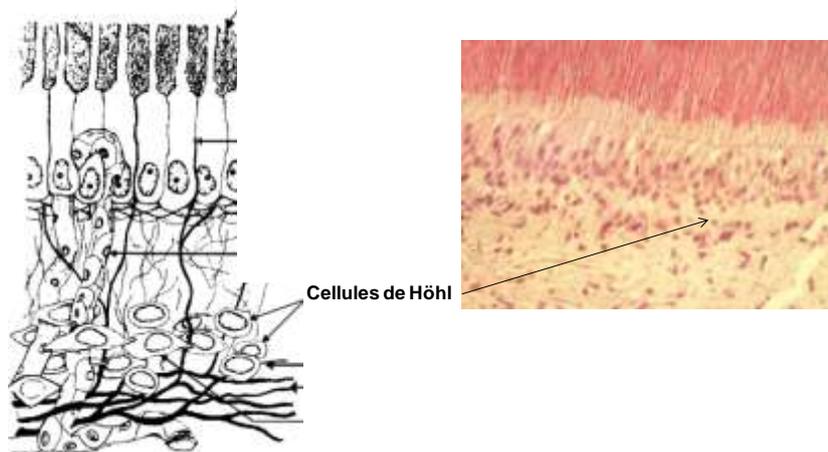


Figure 1.7 : les cellules de Höhl (B. Alliot-Licht).

Les cellules de Höhl sont des cellules rondes avec un noyau volumineux et de rares organites de synthèse (Piette et Goldberg, 2001).

Les cellules de Höhl pourraient être des cellules de relais, susceptibles de se différencier en odontoblastes de remplacement lorsque les odontoblastes sont détruits (Goldberg et Smith, 2004). Elles auraient donc un rôle important dans la dentinogenèse réactionnelle (dentine tertiaire).

1.4. Les fibroblastes pulpaire

Les fibroblastes sont des cellules ubiquitaires présentent dans tous les tissus conjonctifs.

Les fibroblastes pulpaire sont situés dans la zone riche en cellules (zone sous odontoblastique de Höhl) et dans la partie centrale de la pulpe. Ces cellules constituent la majeure partie de la fraction cellulaire pulpaire (Piette et Goldberg, 2001).

Les fibroblastes pulpaire sont des cellules le plus souvent fusiformes, non polarisées avec un noyau volumineux (Goldberg et Smith, 2004). Ils contiennent les organites impliqués dans la synthèse protéique (réticulum endoplasmique granulaire, appareil de Golgi, vésicules de sécrétion...), des ribosomes libres, des microtubules et des microfilaments ainsi que des filaments de type vimentine.

Les fibroblastes pulpaire sont reliés par des gap jonction et des desmosomes permettant les communications intercellulaires (Goldberg et Smith, 2004).

1.4.1 Rôle de synthèse de la matrice extracellulaire pulpaire

Les fibroblastes pulpaire sont responsables de la synthèse et de la dégradation de la matrice extra cellulaire pulpaire dont ils assurent le « turn over » (Goldberg et Smith, 2004).

La matrice extracellulaire pulpaire contient des collagènes et des protéines non collagéniques dans un rapport d'environ un tiers/deux tiers.

Différents types de fibres de collagènes sont présents : du collagène de type I (56%), du collagène de type III (41%), une faible quantité de collagène de type V et VI et du collagène de type IV au niveau de la membrane basale des vaisseaux (Goldberg et Smith, 2004).

Les fibres de collagène ont un rôle structural. La quantité de collagène augmente avec l'âge.

Parmi les protéines non collagéniques de la pulpe dentaire sont retrouvées (Goldberg et Smith, 2004) :

- les glycoaminoglycanes (chondroïtines 4 et 6 sulfate, dermatane sulfate, keratane sulfate, acide hyaluronique) qui ont un rôle de rétention d'eau,
- des protéoglycanes (décorine, biglycane, versicane) qui contribuent à la viscosité de la matrice extracellulaire,
- des glycoprotéines (fibronectine, tenascine, thrombospondine),
- de l'élastine,
- des métalloprotéinases matricielles (essentiellement MMP1 et 2) qui ont un rôle dans le renouvellement de la matrice extracellulaire (dégradation du collagène).

Les MMP sont également impliquées dans les processus inflammatoires et dans la cicatrisation pulpaire car elles permettent la migration des cellules immunitaires à travers la matrice extracellulaire et la formation de nouveaux vaisseaux (Palosaari *et al*, 2003),

- des lipides.

1.4.2. Rôle de cellule immunitaire

Les fibroblastes pulpaire jouent un rôle dans la défense immunitaire innée (Staquet *et al*, 2008) et adaptative (Hahn *et al*, 2007b).

Lors de l'attaque carieuse, les fibroblastes situés sous la zone sous-odontoblastique rentrent en contact de manière précoce avec le pathogènes (bactériens, viraux...) qui pénètrent dans la pulpe. Comme les odontoblastes, les fibroblastes humains, *in vitro*, expriment des TLRs : TLR2, TLR3, TLR4 (Mutoh *et al*, 2007 ; Staquet *et al*, 2008). Les fibroblastes expriment également des chimiokines dont CCL2, CCL7, CCL26, CXCL2, CXCL12 et CXCL14 et le niveau d'expression de certaines de ces chimiokines est augmenté quand les fibroblastes sont stimulés par des agents pathogènes (LTA, ARN viral, LPS). Les fibroblastes pulpaire jouent également un rôle dans la migration des cellules dendritiques immatures (Staquet *et al*, 2008). Les fibroblastes pulpaire sont donc impliqués dans l'immunité innée mais ce rôle est différent que celui joué par les odontoblastes de part la nature des éléments engagés (TLR et chimiokines) en réponse aux pathogènes et par leur pouvoir plus faible d'attraction des cellules dendritiques immatures (Staquet *et al*, 2008).

Les fibroblastes pulpaire par leur activité de synthèse ont donc un rôle physiologique important dans la régulation de la migration et de la différenciation cellulaire.

In vitro, les modèles de culture de cellules pulpaire sont en majorité constitués de fibroblastes. En effet, dans la technique de mise en culture d'explants pulpaire, ce sont les fibroblastes qui migrent des fragments pulpaire et colonisent les boites de culture. De même dans la technique de digestion enzymatique de la pulpe, la majorité des cellules dissociées et cultivées sont des fibroblastes pulpaire. Cependant, il est possible d'induire leur différenciation en odontoblastes par l'adjontion de molécules inductrices comme par exemple le β -glycerophosphate. Depuis 2000 au sein de ces cultures fibroblastiques ont également été identifiées des cellules souches (Gronthos *et al*, 2000 ; Alliot Licht *et al*, 2001).

1.5. Les cellules souches pulpaire

1.5.1. Définition

Une cellule souche est une cellule indifférenciée capable d'auto renouvellement, qui prolifère en culture en formant des CFU (colony forming unit) et qui peut se différencier en différents types cellulaires. Les cellules souches sont issues soit de l'embryon, soit du fœtus, soit de tissus adultes. Il existe plusieurs types des cellules souches.

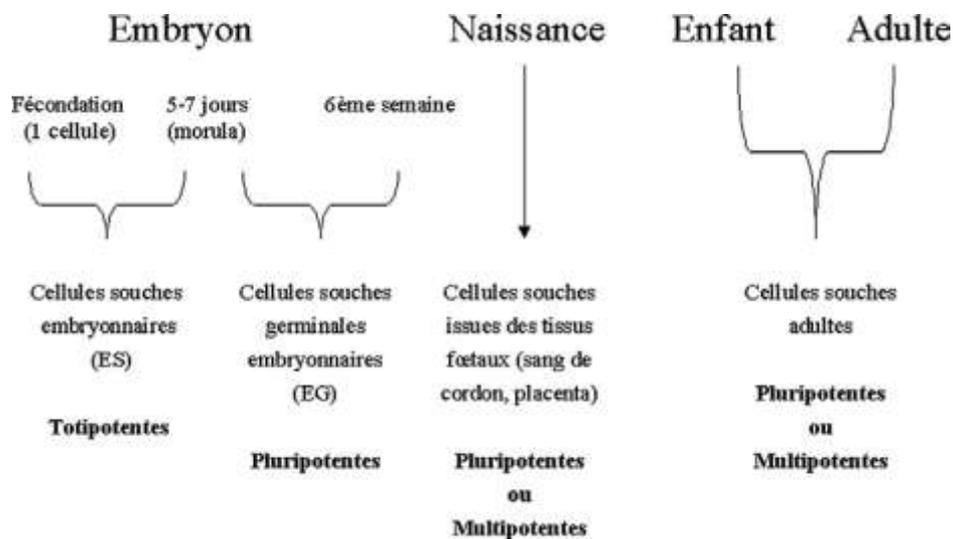


Figure 1.8 : Les différents types de cellule souche (d'après Renard *et al*, 2007)

Les cellules souches **totipotentes**, cellules souches embryonnaires issues des premières divisions de l'oeuf fécondé (jusqu'au 4^{ème} jour), sont capables de donner naissance à tous les types de cellules de l'organisme et sont les seules à permettre le développement d'un organisme entier.

Les cellules souches **pluripotentes** (cellules souches embryonnaires germinales, cellules souches fœtales et adultes) sont capables de donner naissance à plus de 200 types cellulaires représentatifs de tous les tissus de l'organisme (exemple : les cellules des crêtes neurales). Elles sont capables de former un organe mais pas un organisme entier.

Les cellules souches **multipotentes** (cellules fœtales et adultes) sont capables de donner naissance à plusieurs types cellulaires. Par exemple, les cellules souches de la moelle osseuse sont à l'origine des cellules hématopoïétiques, qui donneront toutes les cellules de la lignée

sanguine et des cellules mésenchymateuses (stromales), qui se différencient et forment différents tissus de l'organisme, dont le tissu osseux, le tissu cartilagineux et le tissu graisseux (Fig 1.8).

1.5.2. Identification et localisation dans la pulpe dentaire

Depuis 2000, l'identification, dans la pulpe dentaire, de marqueurs spécifiques des cellules souches a mis en évidence la présence de cellules souches adultes dans le tissu pulpaire.

En culture, il a été observé que certaines cellules de la pulpe dentaire sont capables de former des CFU. De plus, à l'aide d'anticorps monoclonaux, la présence de marqueurs spécifiques, tels que STRO-1 (antigène de surface utilisé comme marqueur des cellules souches de la moelle osseuse), dans la pulpe dentaire a été démontrée à la surface d'environ 6% des cellules de la pulpe dentaire en culture (Shi et Gronthos, 2003), sur des cellules situées à proximité des vaisseaux sanguins et au niveau des périneurions sur des coupes de tissus pulpaire humains (Shi et Gronthos, 2003).

À la périphérie des vaisseaux sanguins, il existe des cellules appelées myofibroblastes (ou péricytes ou cellules de Rouget). Ces cellules répondent aux propriétés des cellules souches. Elles ont une capacité d'autorenouvellement et de différenciation en différents types cellulaires : ostéoblastes, chondrocytes, adipocytes, macrophages, fibroblastes (Doherty *et al*, 1998 ; Farrington-Rock *et al*, 2004). Elles sont caractérisées par des éléments dans leur cytosquelette, tels que l'alpha actine du muscle lisse (α -SMA), et des marqueurs spécifiques, CD146 et 3G5, que l'on retrouve dans les cultures de cellules de pulpe dentaire (Alliot-Licht *et al*, 2001 ; Shi et Gronthos, 2003 ; Farrington-Rock *et al*, 2004). Une colocalisation du marqueur spécifique STRO-1 et de CD146 dans le tissu pulpaire fait suspecter fortement l'analogie entre les cellules souches pulpaire et les péricytes et permettent de conclure que la niche de ces cellules souches est paravasculaire (Shi et Gronthos, 2003).

D'autres études consistent à isoler dans la pulpe dentaire une population cellulaire dite *side population*, ou cellules SP, à l'aide d'un colorant fluorescent Hoechst 33342 lié à l'ADN (Iohara *et al*, 2006). Ces cellules ont été isolées à partir des nombreux tissus contenant des cellules souches mésenchymateuses chez les mammifères (Asakura *et al*, 2002). Cette population, qui possède un grand potentiel d'auto renouvellement, a été caractérisée par de très nombreux marqueurs (récepteurs de la famille des SLAM, CD150, CD244, CD48, CD34,

CD146), mais dans une première étude elles ne présentaient que très peu d' α -SMA (Iohara *et al*, 2006). Les cellules SP ont une grande plasticité et sont capables de se différencier en cellules osseuses, cartilagineuses et neuronales.

On a d'abord pensé que cette population SP pouvait constituer une niche secondaire de cellules progénitrices (Nakashima *et al*, 2006). Mais l'hybridation *in situ* et la microscopie électronique ont permis de localiser certains marqueurs associés aux cellules SP (CD31 et Bcrp1) dans la région périvasculaire de la pulpe dentaire (Iohara *et al*, 2006). De plus, la mise en évidence dans un deuxième temps de l'expression de CD146 et d' α -SMA par ces cellules (Iohara *et al*, 2008) fait penser que les SP sont également des péricytes.

1.5.3. Cellules souches et réparation pulpo-dentinaire

Les cellules souches pulpaires ont un rôle de remplacement des odontoblastes pour former la dentine de réparation qui est le type de dentine tertiaire observé sous un coiffage pulpaire, dans les cas d'agression sévère avec effraction pulpaire et perte des odontoblastes et des cellules de Höhl. En effet, il a été montré que les cellules souches pulpaires sont capables de se différencier en différents types cellulaires dont les odontoblastes et seraient donc impliquées dans les mécanismes de réparation pulpo-dentinaire.

Une étude de Teclès et coll en 2005 a montré l'activation des cellules souches pulpaires en réponse à une agression. Les auteurs ont réalisé des expositions pulpaires sur des dents de sagesse maintenues en culture et ils ont observé l'activation des cellules par marquage au BrdU (5-bromo-2'-desoxyuridine). Un jour après l'agression, le marquage est observé dans les nuclei des cellules dans les zones paravasculaires avec un fort marquage des vaisseaux entourant l'effraction pulpaire. Après deux semaines le marquage n'est plus vasculaire et se rapproche de la cavité créée expérimentalement où doit se faire l'aposition de dentine de réparation. Au bout de 4 semaines, il se situe uniquement au niveau de la zone de l'effraction pulpaire. Les cellules souches de la pulpe dentaire ayant une localisation paravasculaire seraient donc recrutées dans les cas d'agression sévère impliquant la destruction de la couche odontoblastique (Teclès *et al*, 2005).

Différentes études *in vivo* (coiffages pulpaires avec des molécules bioactives) et *in vitro* (effets des molécules de la matrice extracellulaire sur des cultures de ou contenant des cellules

souches pulpaire) ont apportés des éléments de compréhension sur les mécanismes de réparation pulpo-dentinaire et sur l'implication de certaines molécules de la matrice extracellulaire pulpaire et dentinaire. Notamment, il a été montré que le TGFβ1 (Tziafas *et al*, 2001 ; Liu *et al*, 2007 ; Zhang *et al*, 2008), les BMP 2, 4 et 7 (Nakashima *et al*, 1994, 2005 et 2006 ; Iohara *et al*, 2004 ; Goldberg *et al*, 2006 et 2009 ; Yang *et al*, 2007 et 2008), l'IGF1 (Lovschall *et al*, 2001 ; Haddad *et al* 2003), l'Amélogénine (A4+, A4-) (Lacerda-Pinheiro *et al*, 2006 ; Jégat *et al*, 2007), la BSP (Six *et al*, 2002 ; Goldberg *et al* 2006 et 2009) et MEPE (Liu *et al*, 2005 ; Goldberg *et al*, 2006 et 2009 ; Tetè, *et al* 2008) jouent un rôle dans le recrutement, la migration, la prolifération et la différenciation des cellules souches de la pulpe dentaire et dans les processus de minéralisation de la dentine de réparation

1.5.4. Cellules souches et ingénierie tissulaire

La collecte des cellules souches dans la pulpe dentaire est peu invasive et peut s'envisager chez l'enfant (dent temporaire ou dent permanente extraite pour des raisons orthodontiques) et chez l'adulte.

Les cellules souches pulpaire ont une grande plasticité. Ce sont des cellules multipotentes qui cultivées en présence de milieux inducteurs sont capables de se différencier en cellules odontoblastiques, en cellules osseuses, en cellules cartilagineuses, en adipocytes, en cellules nerveuses.

Les cellules souches pulpaire peuvent être conservées par cryopréservation pendant de longues périodes en gardant toutes leurs propriétés (Perry *et al*, 2008 ; Woods *et al*, 2009).

Les cellules souches de la pulpe dentaire ont donc un potentiel important pour l'ingénierie tissulaire dentaire ou extra-dentaire (os, cartilage).

Les cellules souches pulpaire sont capables de reformer un complexe dentino-pulpaire quand elles sont transplantées chez la souris nude (Gronthos *et al* 2000). La génération complète d'une dent par ingénierie tissulaire en combinant cellules souches pulpaire et cellules souches desmodontales semble possible et constitue un challenge pour certaines équipes de recherche.

L'utilisation des cellules souches pulpaires pour l'ingénierie osseuse semble plus rapidement envisageable. Par exemple, Laino et coll ont sélectionné une sous population des cellules souches de la pulpe dentaire (Laino et al, 2005). Ces cellules sont c kit + CD34+ et CD45- et en culture elles présentent toutes les caractéristiques des cellules souches. Elles ont une grande capacité de prolifération cellulaire et sont capables de se différencier en différents types cellulaires (ostéoblastes, adipocytes, cellules nerveuses et cellules musculaires lisses) (Laino et al, 2005 et 2006 ; D'Aquino *et al*, 2009). Elles sont capables de former du tissu osseux quand elles sont cultivées *in vitro* et quand elles sont transplantées *in vivo*. Les cellules souches de la pulpe dentaire pourraient donc être utilisées dans la réparation de défauts osseux (D'Aquino *et al*, 2009).

La présence de cellules souches adultes dans la pulpe dentaire ouvre donc des perspectives intéressantes pour l'ingénierie pulpo/dentinaire, dentaire, mais aussi pour la régénération osseuse, cartilagineuse ou neuronale. La mise au point de cultures cellulaires permettant d'isoler et d'amplifier le plus grand nombre de cellules souches données pour une application clinique donné est d'un intérêt majeur (Peng *et al*, 2007)

1.6. Les cellules immunitaires

Les cellules immunocompétentes représentent 8% des cellules de la pulpe dentaire (Piette et Goldberg, 2001). On retrouve majoritairement des cellules dendritiques et des macrophages (avec un ratio de 4 pour 1) et des lymphocytes T (LTs) en proportion moins importante avec une quantité supérieure de LTs CD8⁺ par rapport eux LTs CD4⁺ (Jontell *et al*, 1998 ; Farges *et al*, 2003). Toutes ces cellules se localisent dans l'ensemble du tissu pulpaire et leur nombre augmente en cas d'agression. Quand l'émail et la dentine sont détruits par l'attaque carieuse, les cellules dendritiques immatures migrent rapidement jusqu'à la couche odontoblastique en regard de la zone cariée. Ensuite, il y a une accumulation progressive et séquentielle de lymphocytes T, de macrophages, de neutrophiles et de lymphocytes B (Goldberg *et al*, 2008).

1.6.1. Les cellules dendritiques

Les cellules dendritiques (DCs) sont des cellules présentatrices d'antigène. Elles ont un noyau excentré et quelques courtes dendrites quand elles sont immatures et de longues dendrites quand elles sont matures. Elles ont comme fonction le dépistage dans les tissus de la présence d'agents infectieux et doivent avoir une forte capacité d'endocytose et de phagocytose et une capacité migratoire efficace. Les antigènes internalisés par les DCs sont dégradés et les peptides antigéniques produits sont exportés vers la surface cellulaire associés aux molécules du CMH (complexe majeur d'histocompatibilité) de classe II et sont présentés aux lymphocytes T.

Les DCs contenues dans la pulpe dentaire, sont des cellules de grande taille (50µm) reliées entre elles par leurs dendrites et formant un réseau continu dans tout le tissu (Jontell *et al*, 1998). Dans la pulpe dentaire plusieurs types de cellules dendritiques sont présents :

- les DCs immatures, les plus fréquentes, sont situées principalement dans la couche sous odontoblastique mais aussi dans la partie centrale de la pulpe. Elles entretiennent des relations étroites avec les capillaires sanguins et les odontoblastes (Yoshihara *et al*, 1996 ; Farges *et al*, 2003). Elles participent à la réponse immunitaire innée,
- les DCs matures qui ont un rôle d'immunosurveillance (Hahn et Liewer, 2007a).
- des DCs en voie de maturation ont été identifiées près du plancher pulpaire et dans les racines (Farges *et al*, 2003).

Les cellules dendritiques de la pulpe dentaire auraient également un rôle dans la différenciation odontoblastique et dans la modulation de l'activité de synthèse des odontoblastes (Hahn et Liewer, 2007a ; Goldberg *et al*, 2008).

1.6.2. Les macrophages

Les macrophages sont de grosses cellules ovalaires, fusiformes ou étoilées avec un noyau excentré et des vacuoles dans leur cytoplasme. Dans la pulpe dentaire, ils sont principalement situés dans les zones périvasculaires (Jontell *et al*, 1998). Ils ont une fonction de phagocytose. Ils sont impliqués dans l'homéostasie tissulaire en éliminant les cellules sénescents, les cellules mortes et les débris cellulaires. Ils participent aussi à l'immunité innée comme défense non-spécifique, mais sont également impliqués dans l'immunité adaptative. En effet,

ils phagocytent les pathogènes (bactériens, viraux...) et comme les cellules dendritiques, ils sont des cellules présentatrices d'antigène (Hahn et Liewer, 2007a et b).

Le tissu pulpaire dentaire est donc constitué de différentes populations cellulaires et d'une matrice extracellulaire riche en molécules inductrices. Sa physiopathologie complexe et unique n'est pas encore complètement élucidée.

II. Première partie expérimentale

Cellules souches et modèle primaire de cellules pulpaire humaines

2.1. Généralités sur les cultures de cellules pulpaire humaines

Les cultures de cellules pulpaire ont été développées pour étudier les mécanismes de réparation dentinaire et la différenciation odontoblastique (Kasugai *et al*, 1993 ; Stanislawski *et al*, 1997 ; About *et al*, 2000 ; Couble *et al*, 2000 ; Tziafas *et al*, 2000). Depuis 2000, plusieurs équipes ont mis en évidence dans ces cultures, la présence de cellules souches adultes qui disposent naturellement de capacités d'auto-renouvellement et d'une grande plasticité. Les équipes de plus en plus nombreuses qui travaillent sur les cellules souches de la pulpe dentaire peuvent se classer en deux catégories. Certaines équipes travaillent à partir de la pulpe totale en dissociant les cellules par digestion enzymatique. D'autres équipes de recherche s'intéressent à sélectionner une sous-population d'intérêt dans la pulpe dentaire.

Un modèle de culture de cellules pulpaire humaines issues de dents de sagesse a été développé au sein de notre laboratoire (Alliot-Licht *et al*, 2001). L'originalité de ce modèle est d'obtenir une minéralisation dans les cultures sans l'ajout de β -glycérophosphate ou de dexaméthasone. Dans ces cultures de cellules pulpaire humaines, nous avons montré la présence de cellules α -actine du muscle lisse positives (SMA+), identifiées comme péricytes par leur aspect morphologique caractéristique en microscopie électronique à transmission (Alliot-Licht, 2001).

Les péricytes sont des cellules pluripotentes capables de se différencier en différents types cellulaires comme les ostéoblastes, les chondrocytes, les adipocytes et les cellules musculaires lisses (Simmons *et al*, 2001, Farrington-Rock *et al*, 2004). Ils sont également considérés comme des précurseurs odontoblastiques (Gronthos *et al*, 2000 et 2003). Comme nous l'avons mentionné précédemment, une colocalisation de STRO-1 (marqueur spécifique des cellules souches) et de CD146 (marqueur spécifique des péricytes) dans le tissu pulpaire fait suspecter fortement l'analogie entre les cellules souches pulpaire et les péricytes et permet de conclure que la niche de ces cellules souches est paravasculaire (Shi et Gronthos, 2003).

Notre modèle primaire de cellules pulpaire humaines est donc un modèle intéressant pour étudier les conditions de cultures optimales afin de permettre le recrutement, la prolifération et la différenciation des cellules souches de la pulpe dentaire. En effet en vue d'une implantation chez l'homme, il est nécessaire de générer le plus rapidement possible une quantité maximale de cellules d'intérêt pour les trier et pouvoir ensuite les utiliser dans une indication donnée (Peng *et al*, 2007).

Dans ce travail, nous avons observé les effets de deux milieux de culture, l'un riche en calcium (MEM) et l'autre riche en phosphate (RPMI) sur le potentiel de différenciation odontoblastique et la proportion de cellules souches. Puis dans un second temps, nous avons étudié les effets de la dexaméthasone. Après avoir décrit le matériel et méthodes nous décrirons successivement les résultats de l'effet du milieu de culture puis de l'effet de la dexaméthasone et nous termineront par une discussion globale de l'ensemble des résultats.

2.2. Matériel et méthodes

2.2.1. Matériel

Les plaques et flacons de culture ont été fournis par Corning-Costar (Corning BV Life Sciences, Schiphol-Rijk, Pays-Bas). Le sérum de veau fœtal (SVF) provient de chez D. Dutscher (Brumath, France). Les milieux de culture (MEM, RPMI) la L-glutamine, les antibiotiques (Pénicilline/Streptomycine), la Trypsine/EDTA, le Trizol, la DNase (désoxyribonucléase), les dNTPs (désoxynucléotides tri phosphate), la *Taq*DNA polymérase, le PBS (Phosphate Buffered Saline) et le tampon TRIS Borate EDTA (TBE) proviennent de chez Invitrogen Corporation (Paisley, UK).

La Dexaméthasone provient de chez Sigma (La Verpillere, France).

L'AMV-RT (avian myeloblastosis virus-reverse transcriptase), les amorces hexanucléotidiques aléatoires et la RNAsin (Recombinant ribonuclease inhibitor) ont été achetés chez Promega (Charbonnière, France).

Le Master Mix a été fourni par Stratagene, le SyBr Green par Molecular Probes Inc. (Amsterdam, Netherlands) et la Titanium Taq DNA polymerase par Clontech (Mountain View, CA, USA).

Le réactif Pierce Coomassie Plus Assay provient de chez Pierce (Rockford, IL, USA).

2.2.2. Cultures cellulaires

Les cellules pulpaire humaines sont obtenues à partir d'explants pulpaire issus de dents de sagesse extraites pour des raisons orthodontiques, sous anesthésie générale, chez de jeunes patients (14-20 ans) ne présentant aucune pathologie générale et ayant donné leur consentement. Une fois la dent extraite, les gaines épithéliales de Hertwig sont éliminées à l'aide d'une pince fine et une rainure coronaire est réalisée à la fraise diamantée sur turbine et sous spray d'eau, sans effectuer d'effraction pulpaire. La dent est ensuite cassée en deux. La pulpe coronaire est alors prélevée et émincée en explants d'environ 1 mm² à l'aide d'un bistouri. Lorsque la dent est peu édiflée et que les apex sont largement ouverts et après élimination de la gaine épithéliale de Hertwig, la pulpe peut être extirpée par les apex à l'aide d'une pince fine.

Les explants sont mis en culture dans des plaques six puits à raison de 2 à 3 explants par puits. Les explants sont ensuite légèrement recouverts de milieu de culture afin de permettre leur adhésion au fond de la boîte. Le milieu de culture utilisé est soit du MEM soit du RPMI supplémenté en :

- pénicilline (100U/ml) et de la streptomycine (100µg/ml) ,
- fungizone (10µg/ml),
- 10% de sérum de veau fœtal (SVF).

Les plaques sont alors placées à 37°C dans une atmosphère humide à 5% de CO₂.

Le milieu de culture est renouvelé trois fois par semaine.

Les explants sont retirés des puits quand à l'observation au microscope à contraste de phase (grossissement x4) tout le champ d'observation entourant l'explant est occupé par des cellules.

Après 31 jours de culture, les primocultures sont réensemencées (P1). Le tapis cellulaire est décollé à la trypsine-EDTA. Après un lavage, les cellules sont remises en suspension et comptées à l'aide d'une cellule de Malassez. Les cellules sontensemencées à une densité cellulaire de 20 000 cellules par cm² dans le milieu de culture complet.

Un nouveau passage est effectué tous les 14 jours. Les cellules sont cultivées jusqu'au 5^{ième} passage (P5).

Pour l'étude de l'effet de la dexaméthasone, 10⁻⁸M de Dex ou son véhicule (0,1% d'éthanol) sont ajouté au milieu de culture.

2.2.3. Etude de la prolifération cellulaire

a) Comptages cellulaires

Les cellules sontensemencées à une densité cellulaire de 20 000 cellules par cm² et sont cultivées dans du RPMI ou du MEM (3 puits par condition). Pour étudier l'effet de la Dex, 10⁻⁸M de Dex ou son véhicule est ajouté au milieu de culture. (3 puits par condition). A différents jours de culture, les cellules sont décollées avec de la trypsine/EDTA et sont comptées à l'aide d'une cellule de Malassez suivant la méthode d'exclusion par le bleu trypan. Les résultats sont exprimés en nombre de cellules par puit ou en pourcentage.

b) Incorporation de thymidine tritiée

La prolifération cellulaire peut être évaluée en quantifiant la synthèse d'ADN par dosage de l'incorporation de thymidine tritiée.

Les cellules sont ensemencées dans des plaques 24 puits à une densité cellulaire de 30 000 cellules par puits et sont cultivées dans du RPMI ou du MEM (6 puits par condition). Pour étudier l'effet de la Dex, 10^{-8} M de Dex ou son véhicule est ajouté au milieu de culture (6 puits par condition).

Le jour du dosage, la moitié du milieu de culture est remplacé par du milieu contenant de la 3 [H] Thymidine ($1\mu\text{Ci/ml}$). Après 4 heures d'incubation, à 37°C dans l'étuve, la totalité du milieu est éliminé. Les cellules sont rincées trois fois avec du PBS, fixées pendant 15 minutes au méthanol (95%). Le tapis cellulaire est alors séché pendant 5 minutes et incubé avec 1 ml de NaOH (0,1 N) pendant 45 minutes à 37°C dans une atmosphère à 5% de CO_2 . La soude de chaque puits est alors récupérée et 4 ml de liquide à scintillation sont ajoutés. La radioactivité est lue à l'aide d'un compteur à scintillations β (Beckman LS 6 000SC).

2.2.4. Activité phosphatase alcaline

La phosphatase alcaline (ALP) est une enzyme qui fournit les ions phosphates utilisés au cours de la minéralisation. L'ALP est considérée comme un marqueur des cellules en voie de différenciation en cellules ostéoblastiques, mais son rôle exact dans la minéralisation n'est pas encore complètement élucidé. Parmi les trois isotypes décrits, la forme tissulaire non spécifique (rein-foie-os) est retrouvée au niveau de la pulpe (Goseki *et al*, 1990 ; San Miguel *et al*, 1999). La phosphatase alcaline peut être observée de façon qualitative par coloration ou de manière quantitative par dosage de l'activité enzymatique.

a) Mise en évidence de l'activité Phosphatase alcaline par coloration

Les cellules sont ensemencées dans des plaques 6 puits à une densité cellulaire de 100 000 cellules par puit et sont cultivées dans du RPMI ou du MEM. Le milieu de culture est renouvelé trois fois par semaine.

Après 14 jours de culture, le milieu de culture est éliminé et le tapis cellulaire est fixé avec une solution de Citrate concentré (SIGMA) et d'acétone (2 volumes de tampon citrate dans trois volumes d'acétone) pendant 30 secondes à température ambiante. Les cellules sont ensuite rincées pendant 45 secondes à l'eau distillée.

Une capsule de Fast violet B (SIGMA) est diluée dans 48 ml d'eau distillée. 2 ml de Naphtol AS-MX (SIGMA) sont ensuite ajoutés au mélange. Les cellules sont alors incubées avec la solution ainsi obtenue pendant 30 minutes à température ambiante et à l'abri de la lumière. Après un rinçage de 2 minutes à l'eau distillée, le tapis cellulaire est recouvert d'une solution d'Hématoxyline de Mayer pendant 10 minutes. Après plusieurs rinçages à l'eau distillée afin d'enlever l'excès de colorant, les cellules sont observées au microscope à contraste de phase.

Suite à l'activité phosphatase alcaline le naphthal AS-MX est libéré et se couple immédiatement à un sel de diazonium (contenu dans la capsule Fast violet B) formant un pigment insoluble visible sur les sites d'activités de la phosphatase alcaline. Les cellules ayant pris une coloration violette seront considérées comme positives c'est-à-dire exprimant l'enzyme à leur surface.

b) Mesure de l'activité phosphatase alcaline

Les cellules sontensemencées à raison de trois puits par condition dans des plaques 6 puits à une densité cellulaire de 100 000 cellules par puits et sont cultivées dans du RPMI ou du MEM. Pour l'étude de l'effet de la dex les cellules sont cultivées en présence de Dex (10^{-8} M) ou de son véhicule. Après 7, 10, 14 jours de culture, le milieu de culture est éliminé et le tapis cellulaire est rincé trois fois avec du PBS puis perméabilisé avec 1 ml d'une solution de Tris triton (10 mM Tris-HCl, 5 mM MgSO₄, 0,1% Triton X100, 0,1% NaNO₃). Les cellules sont ensuite congelées (- 20°C) et décongelées trois fois (pour rompre les membranes cellulaires). Après la troisième décongélation, le Tris triton contenant les cellules est transféré dans des eppendorfs, passé aux ultrasons pendant 5 minutes pour rompre les membranes cellulaires, puis centrifugées à 4000 g à 4°C pendant 15 minutes.

L'activité phosphatase alcaline est déterminée dans chaque lysat par l'hydrolyse de paranitrophényl phosphate (PNPP) dans du tampon 2-amino-2-méthyl-1-propanol (tampon AMP) (Ph 10,4) à 37°C pendant 40 minutes. La quantité de paranitrophénol libéré est

mesurée par un spectrophotomètre à 405 nm. La spécificité de l'enzyme est contrôlée par du Levamisol (inhibiteur spécifique de l'activité phosphatase alcaline non spécifique).

Echantillons : 40 µl de solution biologique
20 µl de PNPP
140 µl de tampon AMP

Blanc : 20 µl de PNPP
180 µl de tampon AMP

Contrôle : 40 µl de solution biologique
20 µl de PNPP
120 µl de tampon AMP
20 µl de levamisole

Les dosages de protéines de chaque échantillon sont réalisés selon la méthode de Bradford (Bradford, 1976) en utilisant de l'albumine sérique bovine (BSA) comme standard. La lecture est effectuée à une longueur d'onde de 505 nm.

Echantillons : 40 µl de solution biologique
900 µl de solution de Bradford
60 µl de PBS

Blanc : 40µl de Tris triton
900 µl de solution de Bradford
60 µl de PBS

L'activité phosphatase alcaline est rapportée à la concentration de protéines totales et est exprimée en nM de paranitrophénol/minutes/µg de protéines

2.2.5. Mise en évidence des cellules SMA+ et des cellules STRO-1+ : Marquages immunofluorescents et analyse quantitative par cytométrie de flux

Parmi les différents types cellulaires potentiellement présents dans nos cultures nous sommes plus particulièrement intéressés à mettre en évidence les cellules souches.

a) α - actine du muscle lisse

Pour les **immunomarquages**, les cellules sont ensemencées sur des lamelles de verre (spécialement traitées pour la culture cellulaire et stérilisées) dans des plaques 24 puits à une densité cellulaire de 30 000 cellules par puits et sont cultivées dans du RPMI ou du MEM avec ou Dex ou son véhicule. Après 4 jours de culture, les cellules sont rincées deux fois avec du PBS (GIBCO), puis fixées dans une solution de paraformaldéhyde à 4% pendant une heure à 4°C. Dix minutes avant la fin de la fixation, une solution de PBS-Triton 0,1% est ajoutée afin de perméabiliser les cellules. Après deux rinçages au PBS, les cellules sont incubées dans un tampon de saturation de PBS-BSA 3% pendant 20 minutes à température ambiante. Les lamelles sont ensuite incubées avec l'anticorps monoclonal anti α actine du muscle lisse (IgG2a anti-humain produit chez la souris, dilution 1/400^{ème}, Sigma, France), pendant 45 minutes à 37°C, rincées deux fois avec du PBS puis incubées avec un anticorps anti souris couplé FITC (IgG1 anti souris couplé FITC produit chez la chèvre, dilution 1/64^{ème}, Sigma, France) pendant 30 minutes à température ambiante, à l'abri de la lumière.

Des contrôles négatifs sont réalisés en suivant le même protocole mais en remplaçant le premier anticorps par un contrôle isotypique IgG2a de souris (Sigma, France).

Après deux rinçages au PBS et montage à l'aide d'un liquide de montage antifading les cellules sont observées avec un microscope équipé pour la fluorescence (Olympus BX60).

Dans le but de quantifier le pourcentage de cellules SMA+ dans notre modèle hétérogène de culture nous avons utilisé la **cytométrie de flux**.

Un million de cellules sont ensemencées dans des flasques 75 cm² et sont cultivées dans du RPMI ou du MEM avec Dex (10⁻⁸M) ou son véhicule. Après 4 jours de culture, les cellules sont décollées avec de la trypsine-EDTA, lavées et le culot cellulaire est remis en suspension dans 200 μ l de PBS. Les cellules sont comptées et redistribuées dans des tubes eppendorf à raison de 500 000 cellules par tube. Après un deuxième lavage et une fixation au

paraformaldéhyde à 4% pendant 30 minutes à température ambiante, les membranes cellulaires sont perméabilisées avec une solution de PBS-triton (0,025%) pendant 15 minutes. Les cellules sont ensuite rincées deux fois au PBS. Les sites non spécifiques sont saturés avec du sérum AB humain décomplémenté (Centre de transfusion sanguine, Nantes) pendant 15 minutes, puis les cellules sont incubées avec l'anticorps monoclonal anti α actine du muscle lisse humain (IgG2a produit chez la souris, dilution 1/200^{ème}, Sigma, France), pendant une heure à température ambiante. Après deux rinçages au PBS, les sites non spécifiques sont de nouveau saturés avec du Sérum AB pendant 15 minutes avant le marquage avec le deuxième anticorps anti souris couplé FITC (IgG1 anti souris couplé FITC produit chez la chèvre, dilution 1/64^{ème}, Sigma, France) 30 minutes à température ambiante, à l'abri de la lumière. Après deux rinçages au PBS, les cellules sont remises en suspension sur de la glace, dans du formol 1% pour l'analyse en cytométrie en flux.

Des contrôles négatifs, afin de déterminer le marquage de bruit de fond, sont réalisés en suivant le même protocole mais en remplaçant le premier anticorps par un contrôle isotype IgG2a.

La fluorescence cellulaire a été analysée sur 5000 évènements collectés dans un Beckon Dickinson FACS Calibur en utilisant le programme Cell-Quest software (BD, biosciences, San Diego, CA).

b) STRO-1

Les immunomarquages de STRO-1 ont été réalisés sur des cellules pulpaire humaines cultivées dans du RPMI ou du MEM avec Dex (10^{-8} M) ou son véhicule après 14 jours de culture et après 4 jours de culture pour le MG-63 et les SaOS-2. Les lames de cyto centrifugation sont préparées à 500 rpm, 5 mn dans un cytospin (Shandon) en utilisant 20 000 cellules par lame. Les cellules sont ensuite séchées à l'air pendant une nuit, puis fixées à l'acétone 5 mn et conservées à -20°C . Les marquages sont effectués dans une chambre humide à température ambiante. Les cellules sont réhydratées dans du PBS supplémenté avec 2% de SVF (tampon de rinçage) 5 mn puis incubées avec du surnageant contenant l'anticorps anti-STRO-1 (21 $\mu\text{g/ml}$) (DHSB, Iowa, USA) ou l'anticorps monoclonal contrôle isotypique d'IgM de souris pendant une heure. Après deux rinçages, les cellules sont incubées avec l'anticorps monoclonal anti IgM de souris (μ -chaîne spécifique) couplé FITC (Sigma, France) pendant 30 mn. Finalement, les cellules sont lavées au PBS et contre-colorées avec du PBS contenant 0,002% de bromure d'éthidium pendant 30 s. Après un rinçage à l'eau courante,

les lames sont montées avec 90% de gélatine-glycérol dans du PBS contenant 2,5% de DABCO. Le marquage est examiné à l'aide d'un microscope à lumière fluorescente (Olympus BX60).

L'analyse par FACS de l'expression de STRO-1 ont été réalisés sur des cellules pulpaire humaines cultivées dans du RPMI ou du MEM avec Dex (10^{-8} M) ou son véhicule après 14 jours de culture et après 4 jours de culture pour le MG-63 et les SaOS-2. Les cellules sont décollées avec de la trypsine-EDTA, lavées et le culot cellulaire est remis en suspension dans du PBS. Les cellules sont comptées et redistribuées dans des tubes eppendorf à raison de 250 000 cellules par tube. Les cellules sont incubées dans 100µl de surnageant contenant 21µg/ml d'anticorps antiSTRO-1 ou avec le contrôle isotypique d'IgM de souris, 1 heure à 37°C. Les cellules sont lavées au PBS et remises en suspension avec l'anticorps monoclonal anti IgM de souris (µ-chaîne spécifique) couplé FITC et incubées 45 mn sur de la glace. Les cellules sont alors lavées et fixées dans du paraformaldéhyde (2%) avant l'analyse de la fluorescence cellulaire effectuée sur 5000 évènements collectés dans un Beckon Dickinson FACS Calibur en utilisant le programme Cell-Quest software (BD, biosciences, San Diego, CA).

2.2.6. Etude des marqueurs de différenciation odontoblastique

a) Extraction d'ARN

Un million de cellules sont ensemencées dans des flasques 75 cm² et sont cultivées dans du RPMI ou du MEM avec Dex (10^{-8} M) ou son véhicule.

Aux jours de culture choisis, les lysats cellulaires sont récupérés par grattage dans 1ml de Trizol sur de la glace, et centrifugés à 13 200 g pendant 10 minutes à 4°C. 200µl de chloroforme sont ajoutés au surnageant puis centrifugés à 13 200 g pendant 15 minutes à 4°C. Les ARN totaux contenus dans la phase aqueuse sont alors précipités par ajout de 500 µl d'isopropanol, puis centrifugés à 13 200 g pendant 15 minutes à 4°C. Le culot est lavé à l'éthanol 75%, séché, puis repris dans 50µl d'eau distillée. La concentration d'ARNm est mesurée par lecture de la densité optique (DO) à 260 nm et la pureté des ARN est évaluée par le rapport des DO à 260 et 280 nm. La concentration des ARN est alors ajustée à 1µg/µl.

2,5µg d'ARN sont traités par 0,1UI/µl de DNase dans son tampon de réaction (Invitrogen) dans un volume final de 10µl pendant 15 minutes à température ambiante puis 10 minutes à 65°C après ajout d'1µl d'EDTA (Invitrogen).

L'absence de dégradation des ARN et l'absence d'ADN génomique sont vérifiées par migration sur gel d'agarose à 1%.

b) RT-PCR

Les ARN subissent une reverse transcription à 42°C pendant 50 minutes par 0,33 UI/μl d'AMV-RT et en présence de 1mM de dNTPs, 50nM d'amorces hexanucléotidiques aléatoires, 6μl de tampon de reverse transcription (5X) (Invitrogen) et 1,33UI/μl de RNasin dans un volume final de 30μl. Cette étape de transcription réverse aboutit à la synthèse de 2,5μl d'ADN complémentaires des ARNm initialement extrait des cellules.

Puis 2,5μl d'ADNc sont amplifiés par 0,1 UI/μl de *Taq*DNA polymérase avec 0,2mM de chacune des amorces spécifiques de l'ADNc à détecter dessinées par le logiciel Beacon Designer 5.0, (cf. Tableau 1), 0,2μM dNTPs, 1μM MgCl₂ et 2,5μl de tampon de réaction (10X) (Invitrogen) dans un volume final de 25μl.

L'amplification est réalisée dans un thermocycleur « Eppendorf Mastercycler personal » (Heidelberg, Allemagne). Après une première phase de dénaturation des ADNc à 95°C pendant 3 minutes, l'ADNc est amplifié par cycle comprenant trois phases de 20 secondes : une dénaturation à 95°C, une hybridation avec les amorces à 60°C et une élongation à 72°C. Le nombre de cycle est référencé dans le tableau 2.1ci-dessous.

Nom du transcrit	Amorces (5'-3')	Température annilation	Taille amplicon	Nombre de cycles
DSPPP	Sens: GAGGATAAAGGACAACATGG Antisens: AAGAAGCATCTCCTCGGC	54°C	280 pb	38
PTH/PTHrp receptor	Sens: AGAAGAAGTACCTGTGGGGCTTCA Antisens: TTCCGGTACTGCTGCCGTGT	58°C	265 pb	35
RUNX2	Sens: GTGGACGAGGCAAGAGTTTCA Antisens: TGGCAGGTAGGTGTGGTAGT	59°C	698 pb	35
ON	Sens: ATGAGGGCCTGGATCTTCTT Antisens: CTGCTTCTCAGTCAGAAGGT	58°C	576 pb	32
LPL	Sens: CTGTTGCCAGAGATGGAGGTT Reverse: TCATCGCTCAGGAGTCTT	59°C	393 pb	38
GAPDH	Sens: ATCACTGCCACCCAGAAGAC Antisens: ATGAGGTCCACCACCCTGGTT	57°C	443 pb	23

La migration des produits de PCR se fait dans un gel d'agarose à 2%. La révélation des bandes d'ADN se fait par du Bromure d'éthidium à l'aide d'un trans illuminateur UV.

2.2.7. Analyse statistique

Chaque expérience a été réalisée en triplicate et répétée au moins deux fois avec des résultats similaires. Des études comparatives à partir des moyennes, ont été réalisées en utilisant un test ANOVA avec des valeurs significatives pour $p < 0,05$. Les résultats sont exprimés en moyenne des valeurs \pm SEM.

2.3. Mise en évidence de l'effet des conditions de culture

2.3.1. Intérêt de l'étude

Les cultures primaires de cellules pulpairees sont hétérogènes : plusieurs types cellulaires et différents stades de différenciation d'un même type cellulaire sont présents (Panagakos, 1998). Les conditions de culture ont une influence sur les sous-populations cellulaires en présence (Nakashima, 1991). L'expression d'un phénotype cellulaire particulier dépend du matériel biologique utilisé, de sa manipulation, mais également des conditions de culture (Coelho *et al*, 2000a et b). Plusieurs études comparant la croissance et la morphologie des cellules pulpairees avec différents milieux de cultures ont été réalisées. Pissiotis et Spangberg (1993) préconisent l'emploi du MEM car ils ont observé une meilleure prolifération cellulaire en MEM en comparaison avec d'autres milieux de culture. Nakashima (1991) a mis en évidence une majorité de cellules de type fibroblastique et une meilleure prolifération cellulaire en DMEM, alors qu'en RPMI 1640, il a observé des cellules plus grandes avec un contour irrégulier et une prolifération moins importante. Il préconise donc l'emploi du DMEM et déconseille l'utilisation du RPMI 1640.

Le choix du milieu de culture est donc important et influence les différentes sous-populations cellulaires en présence. Des travaux antérieurs réalisés dans notre laboratoire ont mis en évidence la présence de cellules SMA+ dans des cultures réalisées en RPMI 1640 (Alliot-Licht *et al*, 2001). Afin de déterminer les conditions de cultures les plus favorables au recrutement, à la croissance et à la différenciation des cellules souches éventuellement pour la thérapie cellulaire, nous avons décidé de tester deux milieux de culture : le RPMI 1640 (milieu utilisé jusqu'alors pour la mise au point du modèle cellulaire) et le MEM (milieu le plus couramment utilisé pour la culture de cellules pulpairees). Ces deux milieux diffèrent essentiellement par leur composition en acides aminés, en vitamines et dans la quantité de calcium et de phosphate en présence :

- Le **MEM** contient 30 composants : les 13 acides aminés essentiels, 9 vitamines, 6 espèces ioniques, du glucose et du sérum. Ces éléments sont suffisants pour cultiver la plupart des lignées humaines (Eagle, 1959). Le MEM contient aussi 1,8 mM de calcium et 1 mM de phosphate,
- Le **RPMI 1640** est un milieu plus riche car il comporte 39 composants. Il contient les 13 acides aminés essentiels plus 7 autres acides aminés dont par

exemple la proline (qui entre dans la composition de nombreuses protéines).

Le RPMI contient 0,8 mM de calcium et 5 mM de phosphate.

En résumé, le MEM est riche en calcium et le RPMI est riche en phosphate.

Dans cette étude nous avons observé la morphologie, la prolifération et la différenciation des cellules pulpaire cultivées soit en RPMI soit en MEM. Les cellules de chaque patient sont partagées en deux lots et cultivées de façon simultanée avec le même lot de sérum.

2.3.2. Résultats

2.3.2.1. Effet du milieu de culture sur la morphologie cellulaire

a) Aspect cellulaire en primoculture

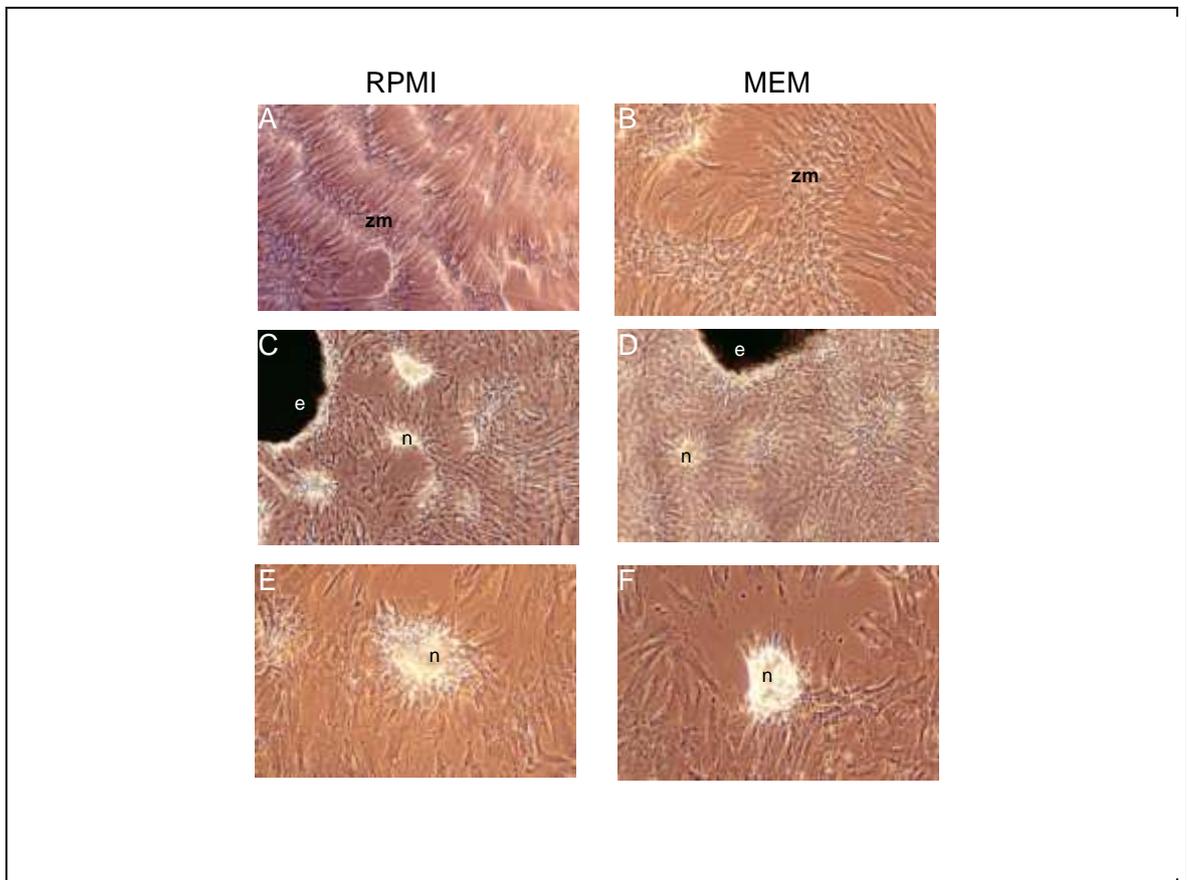


Figure 2.1 : Morphologie cellulaire des primocultures de cellules pulpaire humaine cultivées en RPMI 1640 (A, C, E) ou en MEM (B, D, F) pendant 20 jours (A, B, E, F) et 25 jours (C, D). Les clichés réalisés au microscope à contraste de phase montrent les différents aspects cellulaires : rétraction cellulaire avec formation d'organisation en collines et vallées (cv) (A, B) et nodules (n). Grossissement initial x100 (A, B, C, D) et x150 (E, F).

L'étude en microscopie à contraste de phase montre que les cellules cultivées avec les deux milieux de culture présentent une morphologie similaire (Fig 2.1). Des organisations multicellulaires ou nodules et des zones de rétraction cellulaire où les cellules sont disposées en « collines et vallées » (cv) sont observées. Ces aspects cellulaires ont été précédemment décrits dans notre modèle (Alliot Licht *et al*, 2001) et dans des cultures pures de péricytes vasculaires (Proudfoot *et al*, 1998).

Dans les primocultures, l'apparition de nodules est observable quel que soit le milieu utilisé, autour de J21. La formation des nodules est précédée par un phénomène de rétraction cellulaire. Au cours des passages, les nodules se forment dès le quatrième jour de culture, quel que soit le milieu utilisé (Fig. 2.7 A). La fréquence et le nombre des nodules sont très variables en fonction des passages et des patients.

b) Mise en évidence des cellules SMA+

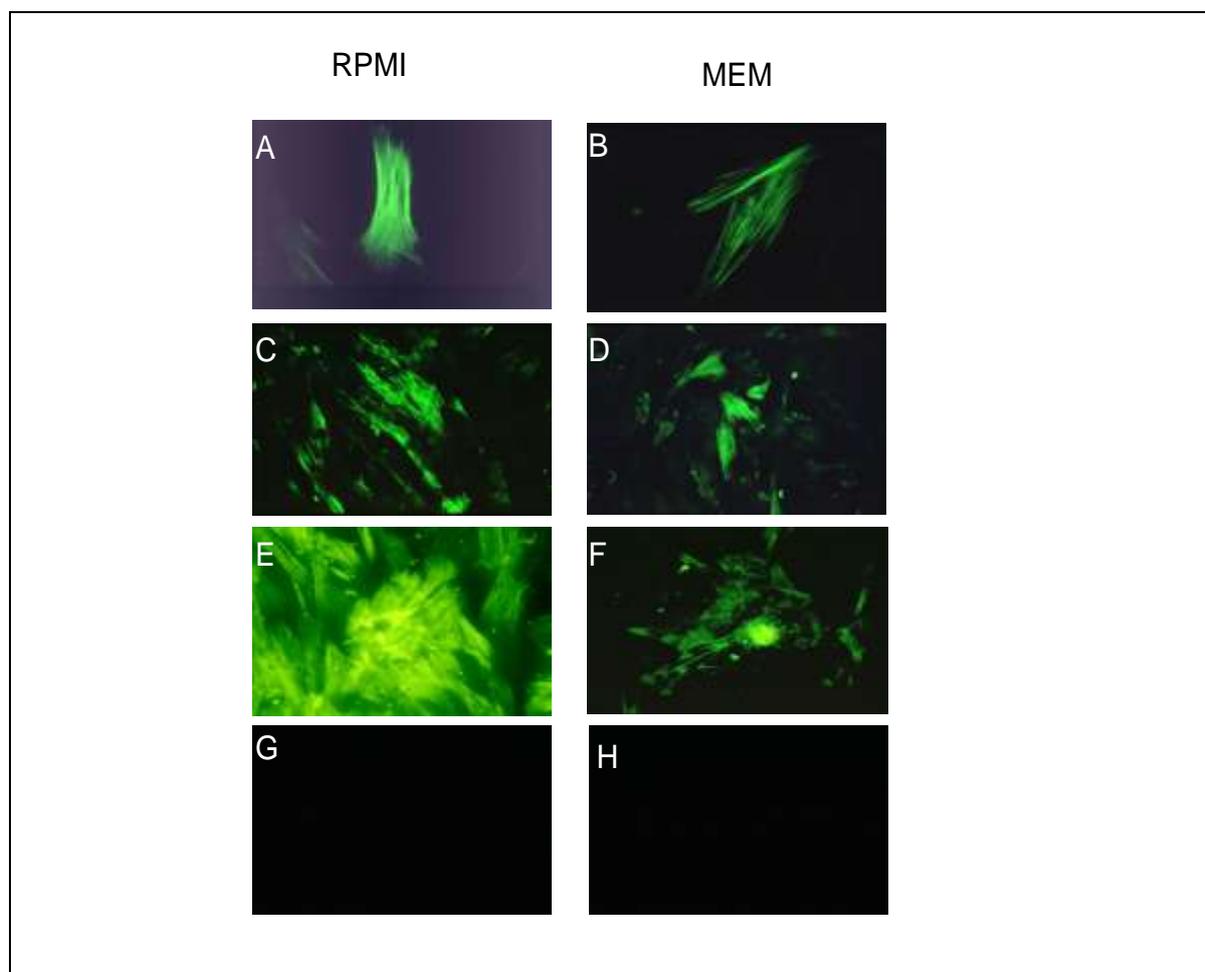


Figure 2.2 : Immunomarquages des cellules α actine du muscle lisse positives. **A et B** : cellules SMA+ isolées. **C et D** : cellules SMA+ groupées. **E et F** : cellules SMA+ entourant un nodule. **G et H** : Contrôles isotypiques (Grossissement initial A et B x400 ; C, D,F, G et H x200; E x300).

Les cellules α actine du muscle lisse positives (SMA+) observées par immunomarquage sont isolées, groupées ou en amas autour des nodules quel que soit le milieu de culture utilisé, quel que soit le donneur et le passage (Fig. 2.2).

2.3.2.2. Effet du milieu de culture sur la prolifération cellulaire

a) En Primoculture

- Nous avons tout d'abord étudié si le milieu de culture avait un effet sur la migration cellulaire à partir des explants.

	J3	J7	J14
RPMI	24	53	108
MEM	49	79	110

Tableau 2.2 : Migration cellulaire à partir des explants : 118 explants issus de 7 patients différents ont été mis en culture dans chaque milieu. Le chiffre indique le nombre d'explants présentant des cellules à leur périphérie.

L'étude du tableau 2.2 montre que le milieu de culture influence la vitesse de migration des cellules à partir des explants. A J3, 2 fois plus d'explants présentent des cellules à leur périphérie en MEM par rapport en RPMI. Cependant dès J14, le nombre d'explants entourés de cellules est identique quelque soit le milieu de culture.

- Nous avons ensuite effectué des comptages à J31 avant d'effectuer le premier passage.

	RPMI	MEM	MEM/RPMI
Patient A	105 000	320 000	3,04
Patient B	266 000	716 000	2,70
Patient C	285 000	500 000	1,75
Patient D	733 000	833 000	1,13
Patient E	53 000	800 000	15,00
Patient F	870 000	930 000	1,06
Patient G	236 000	440 000	1,80
Patient H	213 000	893 000	4,18

Tableau 2.3 : Comptages cellulaires exprimés en nombre de cellules divisé par le nombre de puits à J31

A J31, le nombre de cellules obtenues, rapporté au nombre de puits, est donneur dépendant quelque soit le milieu de culture et. Le nombre de cellules compté à J31 est toujours supérieur quand le milieu utilisé est le MEM. Cependant l'écart entre les deux milieux de culture est donneur dépendant (Tableau 2.3).

b) Au cours des passages

- Afin d'étudier l'effet du milieu de culture sur la prolifération cellulaire, nous avons réalisé des incorporations de Thymidine tritiée.

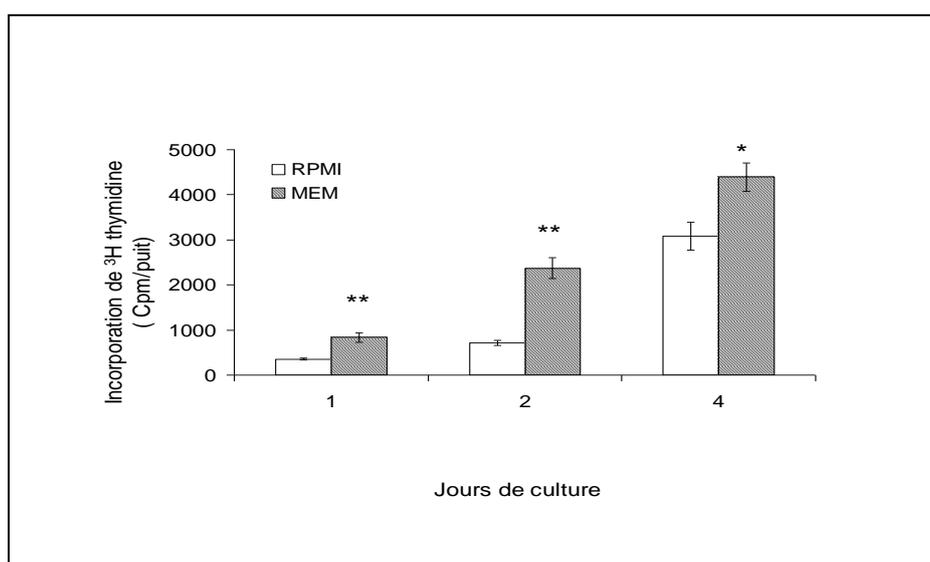


Figure 2.3 : Effet du milieu de culture sur la prolifération cellulaire de cellules pulpaires humaines. Les cellules ont été cultivées avec du MEM ou du RPMI 1640 comme indiqué dans le matériel et méthodes. L'incorporation de [³H] Thymidine est exprimée en cpm par puit. Les résultats sont exprimés en moyenne +/-SEM. Le résultat d'une expérience représentative est montré. * p<0,05 et ** p< 0,01.

A J1, J2 et J4 cette incorporation est significativement plus importante en MEM qu'en RPMI 1640 avec une augmentation respective par 2, 2,5 et 0,5 (p<0,05 à J1 et p<0,01 à J2) (Fig. 2.3).

- Pour confirmer que l'augmentation de l'incorporation de Thymidine tritiée observée en présence de MEM est en relation avec une augmentation du nombre total de cellules en MEM sans augmentation de la mort cellulaire en RPMI 1640, nous avons effectués des comptages cellulaires.

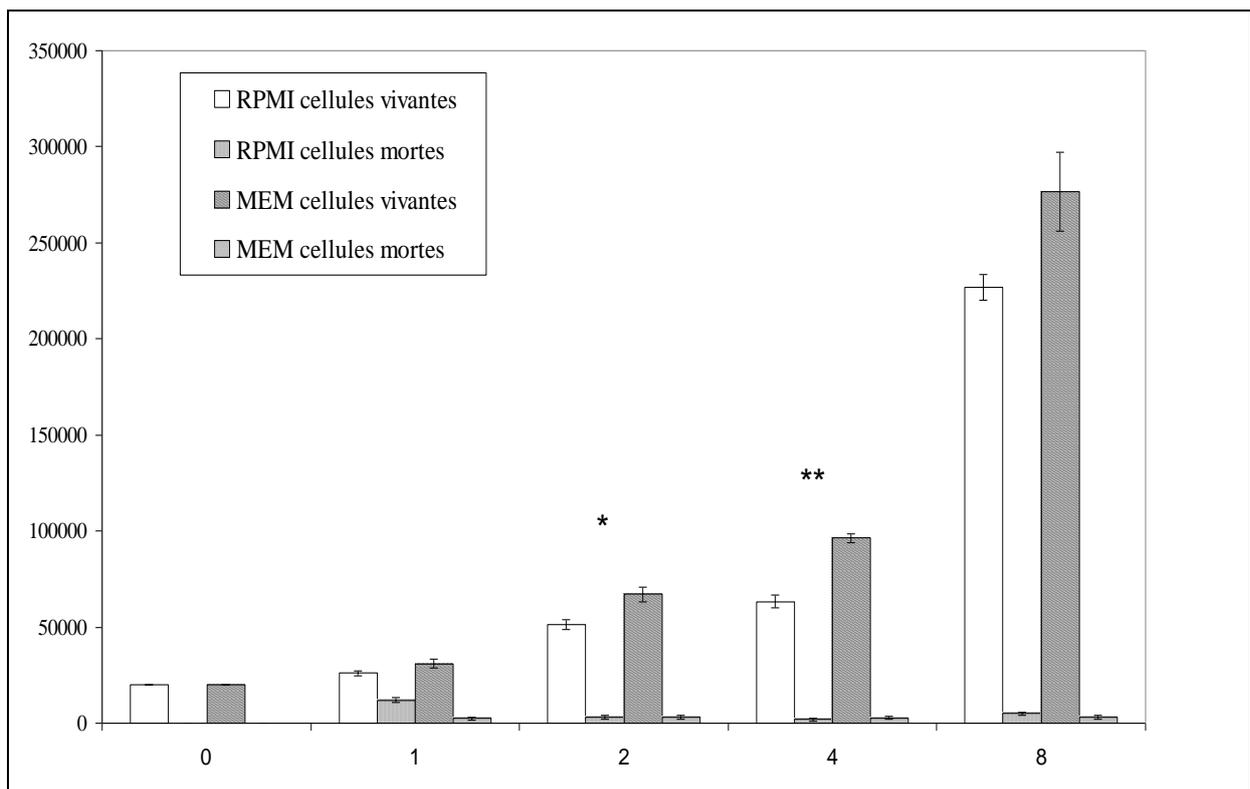


Figure 2.4 : Effet du milieu de culture sur la prolifération cellulaire de cellules pulpaires humaines. Les cellules ont été cultivées avec du MEM ou du RPMI 1640 comme indiqué dans le matériel et méthodes. Les comptages cellulaires sont exprimés en nombre total de cellules. Les résultats sont exprimés en moyenne +/-SEM. Le résultat d'une expérience représentative est montré. * p<0,05 et ** p< 0,01 en comparaison avec le RPMI 1640.

Nos résultats montrent un nombre significativement plus important de cellules quand le milieu utilisé est du MEM, après 2 et 4 jours de culture, sans augmentation du nombre de cellules mortes (Fig.2.4).

2.3.2.3. Effet du milieu de culture sur le pourcentage de cellules SMA+

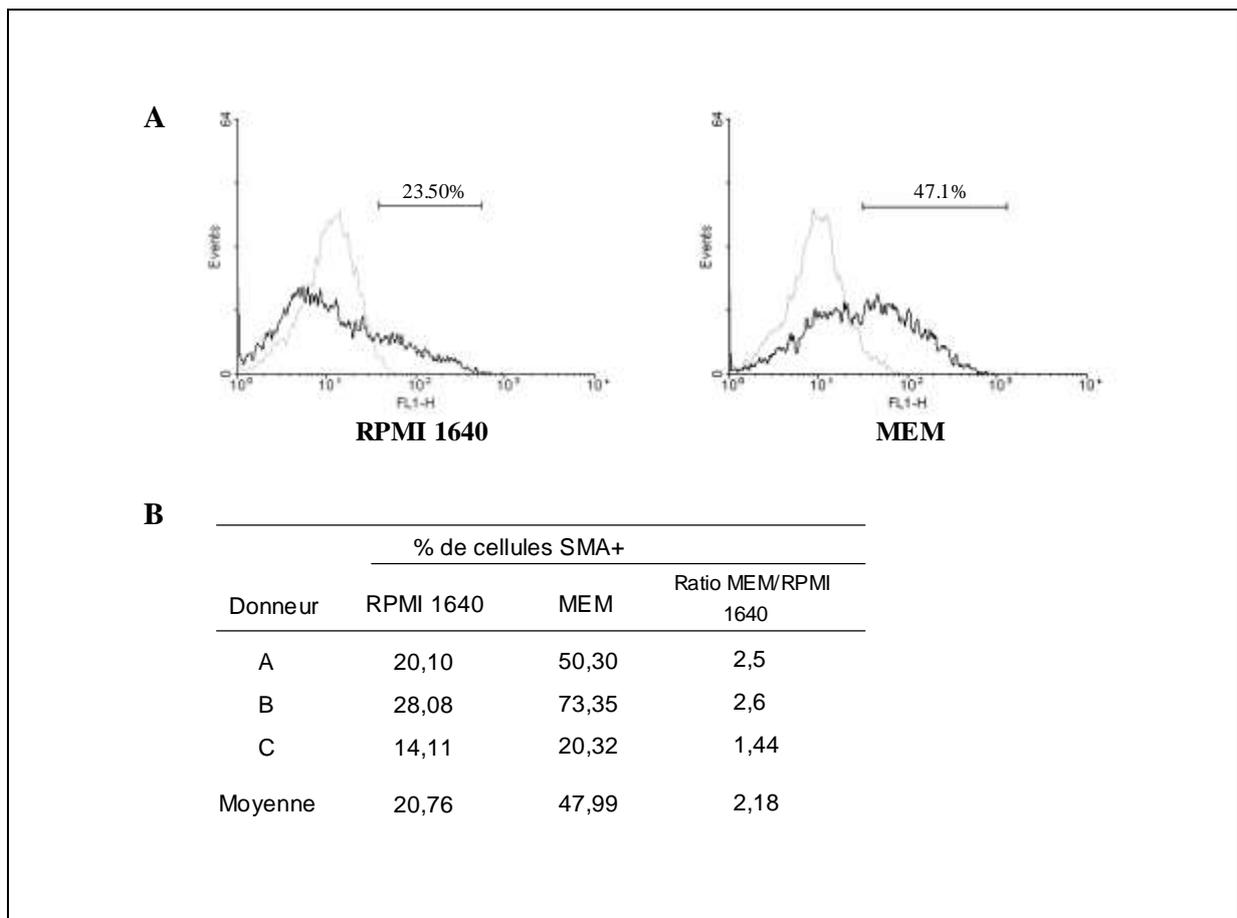


Figure 2.5 : Effet du milieu de culture sur le pourcentage de cellules SMA+ dans des cultures de cellules pulpaire humaines après 14 jours de culture dans du RPMI 1640 ou du MEM. **A :** analyse par FACS du pourcentage de cellules SMA+. Un histogramme caractéristique est montré. La ligne grise représente le marquage avec l'isotype contrôle ; la ligne noire représente le marquage avec l'anticorps

anti SMA. La barre représente les cellules SMA+. **B** : pourcentage de cellules SMA+ en fonction du milieu de culture chez trois différents donneurs.

Les cellules SMA+ sont considérées comme une source possible d'odontoblastes (Miura *et al* 2003, Gronthos *et al*, 2003). Pour appréhender l'effet du milieu sur ce marqueur des péricytes, nous avons étudié le pourcentage de cellules SMA+ dans nos deux conditions de culture par cytométrie de flux. Nos résultats montrent que les cellules pulpaire en présence de MEM présentent 2 fois plus de cellules SMA+ que les cellules cultivées en RPMI 1640 (n=3).

2.3.2.4. Effet du milieu de culture sur la minéralisation des nodules

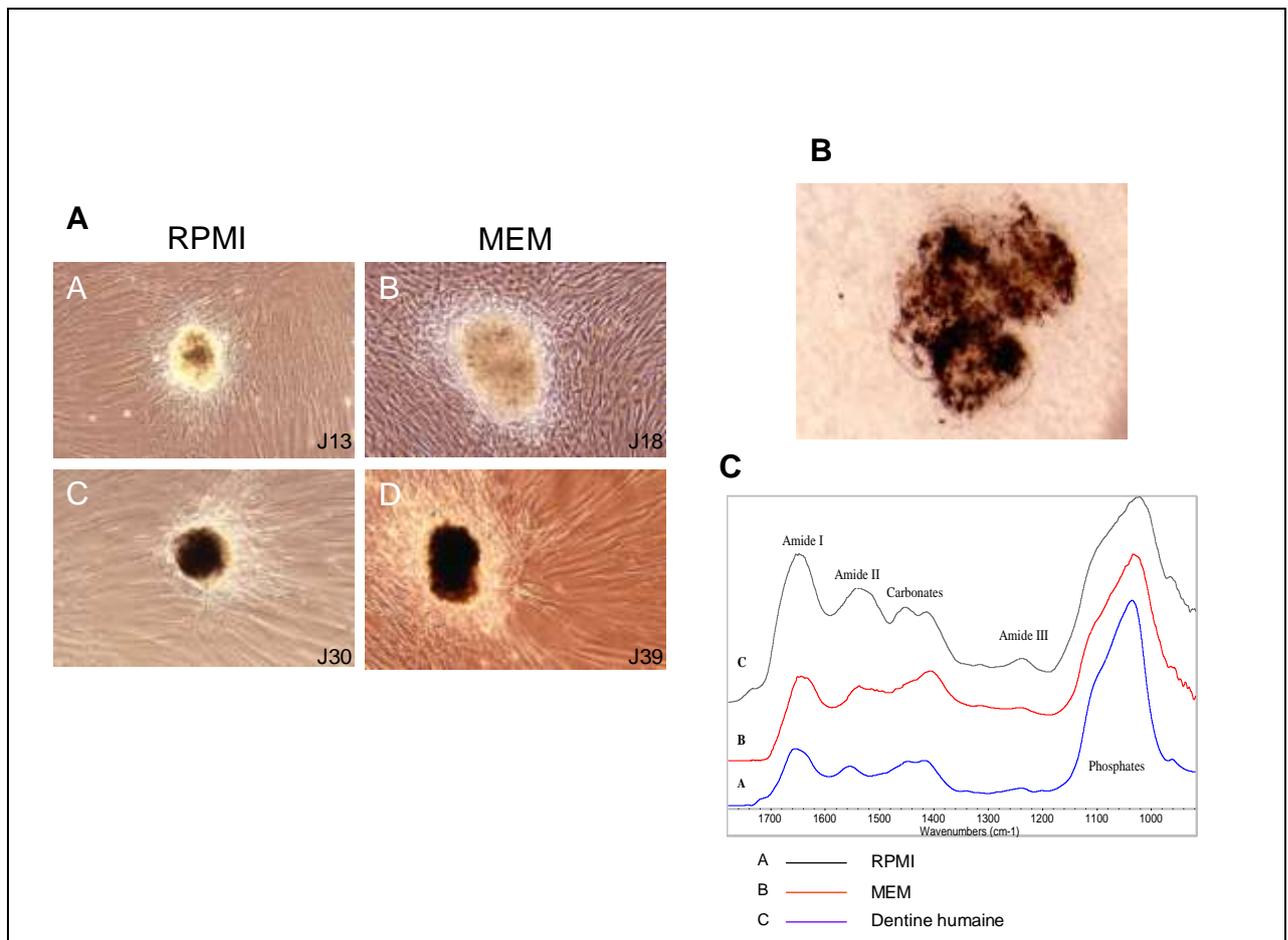


Figure 2.6 : Effet du milieu de culture sur la formation de nodules. **A** : présence de nodules dans des cultures de humaines cultivées en RPMI 1640 (A, C) ou en MEM (B, D). Grossissement initial x100 (A, C, D) et x 200 (B). **B** : Coloration Von Kossa dans un premier passage (P1) d'une culture de cellules

pulpaire en MEM après 30 jours de culture. Grossissement initial x200. C : Analyse par spectroscopie Infra rouge à transformée de Fourier de la phase minérale formée après 30 jours de culture en MEM et en RPMI.

L'observation au microscope à contraste de phase montre une transformation progressive des nodules qui deviennent marrons puis noirs (Fig. 2.6 A).

Les colorations Von Kossa montrent la présence de minéral au niveau des nodules (les ions Ag du colorant se substituant au calcium des composés phosphocalciques) (Fig. 2.6 B). L'analyse en spectroscopie Infrarouge à Transformée de Fourier des nodules montre la présence d'une apatite biologique qui est comparable à celle de la dentine humaine (Fig. 2.6 C). Une minéralisation spontanée est donc observée dans notre modèle quel que soit le milieu de culture utilisé, sans ajout de β -glycérophosphate ou de facteurs de croissance.

L'apparition de ce minéral dans les cultures, ne peut être due à un phénomène de précipitation spontanée car la teneur en Pi et en Ca dans les milieux est trop faible. Dans le but de mieux comprendre si l'apparition du minéral est due à un processus de différenciation cellulaire, nous avons étudié l'expression des transcripts de marqueurs de différenciation odontoblastique et ostéoblastiques.

2.3.2.5. Effet du milieu de culture sur la différenciation cellulaire

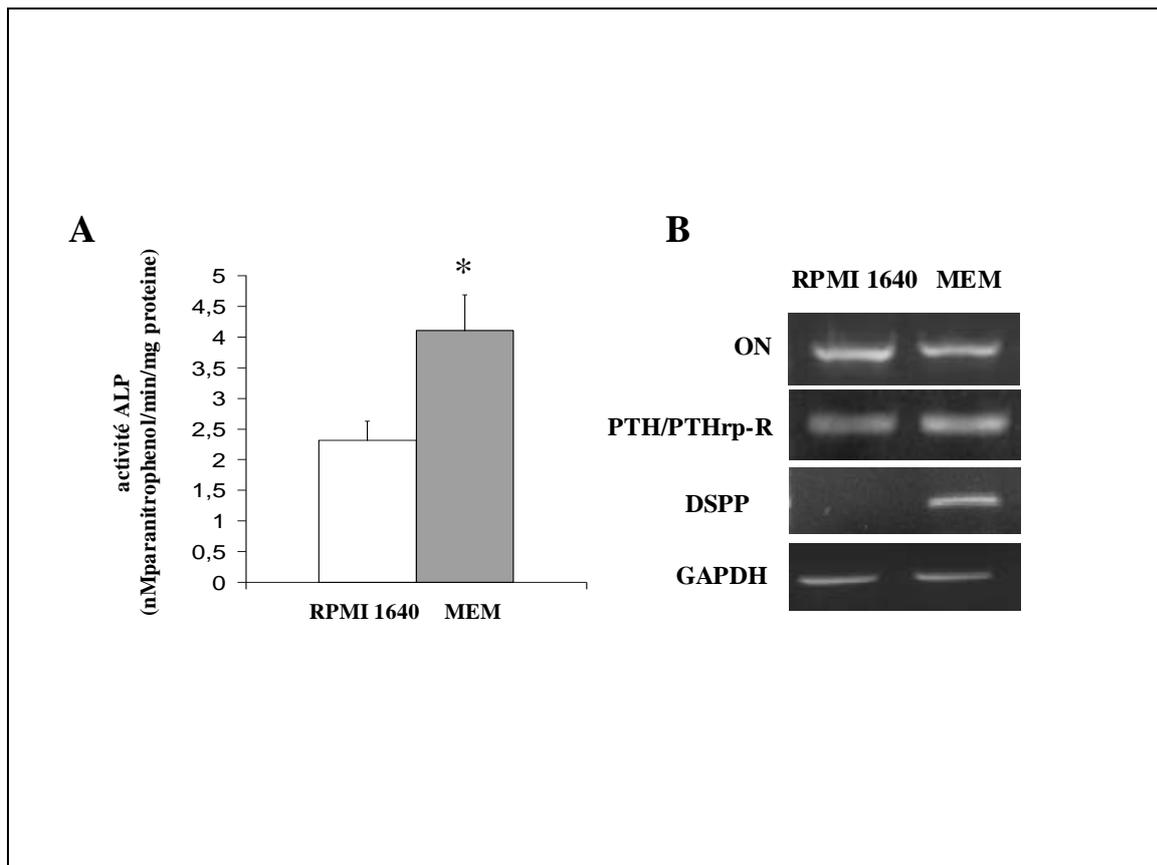


Figure 2.7 : Effet du milieu de culture sur la différenciation cellulaire. **A :** Effet du milieu sur l'activité phosphatase alcaline des cellules pulpaire humaines. L'activité ALP est mesurée après 14 jours de culture. Les valeurs représentent la moyenne d'expérimentations réalisées en triplicata \pm SEM. (* $P < 0,05$, $n = 5$). **B :** Effet du milieu RPMI/MEM sur l'expression des transcrits de l'ostéonectine (ON), du récepteur à l'hormone parathyroïde/ protéine apparentée à la PTH (PTH/PTHrp), de la dentine sialophosphoprotéine (DSPP) après 14 jours de culture. La GAPDH est utilisée comme gène de référence. Un gel d'agarose représentatif est montré.

Afin d'étudier l'effet du milieu de culture sur la différenciation des cellules de la pulpe dentaire humaine *in vitro*, nous nous sommes d'abord intéressé à l'activité phosphatase alcaline. Une activité phosphatase alcaline non spécifique est en effet classiquement décrite sur les cellules impliquées dans la minéralisation pendant la différenciation ostéoblastique et odontoblastique. Nos résultats montrent que l'activité ALP des cellules pulpaire humaines est significativement plus importante en présence de MEM par rapport au RPMI 1640. Elle est deux fois plus forte après 14 jours de culture en MEM en comparaison avec le RPMI 1640 (Fig. 2.7 A).

De plus, nous avons analysé l'effet du milieu de culture sur le niveau d'expression de l'ARNm de différents marqueurs ostéoblastiques et odontoblastiques. Les cultures de cellules pulpaire humaines expriment les ARNm codant pour PTH/PTHrp-R et ON dans les deux conditions de culture alors que seules les cellules cultivées en présence de MEM expriment le transcrit de DSPP, un des marqueurs odontoblastiques majeurs (Fig. 2.7 B).

Le milieu de culture a donc une influence sur la prolifération et la différenciation des cellules pulpaire humaines ainsi que sur le pourcentage des cellules SMA+. Le MEM favorise la prolifération et la différenciation cellulaire et augmente le pourcentage de cellules SMA+. Le RPMI 1640 permettant de cultiver des cellules moins différenciées, constitue donc un milieu intéressant afin d'étudier l'effet de molécules sur la différenciation des cellules souches pulpaire.

2.4. Effet de la Dexaméthasone sur le recrutement et la différenciation des cellules souches dans des cultures de cellules pulpaire cultivées en RPMI

2.4.1. Intérêt de l'étude

La dexaméthasone (Dex) est un glucocorticoïde dont l'effet sur le comportement cellulaire est fonction de l'origine des cellules, de leur degré de différenciation et des conditions de cultures. La Dex inhibe la prolifération des fibroblastes et des ostéoblastes mais stimule la prolifération et la différenciation des ostéoprogéniteurs. (Bellow *et al*, 1990 ; Kim *et al*, 1999, Lévy *et al*, 2001). Dans les cultures de cellules pulpaire, la Dex est couramment utilisée afin d'induire la minéralisation de la matrice dentinaire (Kasugai *et al*, 1993 ; Gronthos *et al*, 2000 ; Miura *et al*, 2003). Cependant, l'effet spécifique de la Dex sur les précurseurs odontoblastiques n'avait jamais été étudié.

L'objectif de cette étude est d'étudier les effets de la Dex (10^{-8} M) sur la prolifération et la différenciation des cellules de la pulpe dentaire humaine. Afin d'identifier si les précurseurs sont sensibles à la dexaméthasone, nous avons étudié dans quelle mesure la proportion de cellules qui expriment SMA ou STRO-1 pouvait être influencée par la Dex. De plus, nous avons évalué dans ce travail si la dex pouvait stimuler la prolifération cellulaire ou induire la différenciation des cellules pulpaire.

Cette étude a pour but d'apporter de nouveaux éléments sur les effets spécifiques de la dexaméthasone sur les cultures pulpaire humaine mais aussi sur les cellules souches présentes dans nos cultures. Ce travail s'inscrit dans le cadre de l'optimisation des conditions de culture afin de permettre le recrutement et la différenciation des cellules souches en vue de leur utilisation en ingénierie tissulaire.

2.4.2. Résultats

2.4.2.1. Effet de la Dex sur la prolifération cellulaire

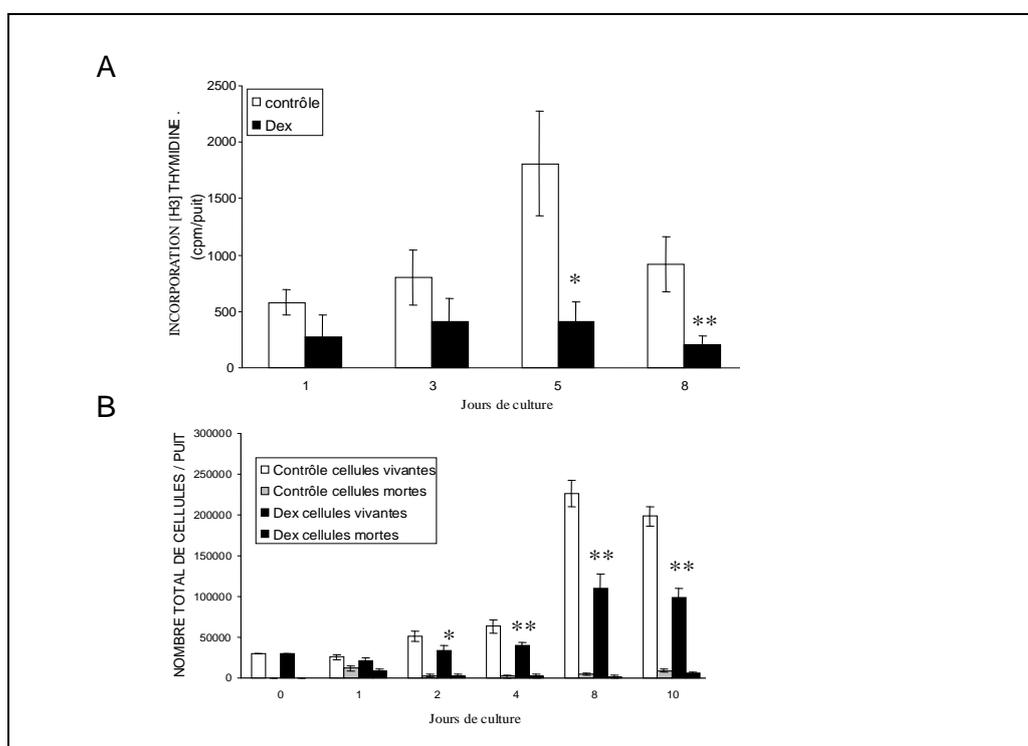


Figure 2.8 : Effets de la Dex sur la prolifération cellulaire de cellules pulpaire humaines. Les cellules sont cultivées avec de la Dex ($10^{-8}M$) ou son véhicule. **A** : Incorporation de [³H] Thymidine. **B** : Comptages cellulaires. Les valeurs représentent la moyenne d'expérimentations réalisées en triplicata \pm SEM. Les résultats d'une expérimentation représentative sont décrits (n=5). (* p<0,05, ** p<0,005 comparé au contrôle).

Nos résultats montrent que la Dex induit une inhibition de la prolifération cellulaire. En effet nous observons une diminution significative de l'incorporation de Thymidine tritiée à J5 et à J8 (Fig. 2.8 A) et la Dex réduit significativement le nombre de cellules vivantes après 2, 4, 8 et 10 jours de culture par rapport au contrôle (Fig. 2.8 B).

Pour confirmer que la baisse de l'incorporation de Thymidine tritiée observée en présence de Dex est en relation avec une diminution du nombre total de cellules sans augmentation de la mort cellulaire, nous avons effectué un comptage des cellules mortes (Fig. 2.8 B). Aucune augmentation du nombre de cellules mortes sous traitement à la Dex n'a été observée pendant toute la période de l'expérimentation.

Comme précédemment, nous avons cherché à savoir si la Dex induisait la prolifération des péricytes présents dans nos cultures.

2.4.2.2. Effet de la Dex sur le pourcentage de cellules souches pulpaire

a) Les cellules SMA+

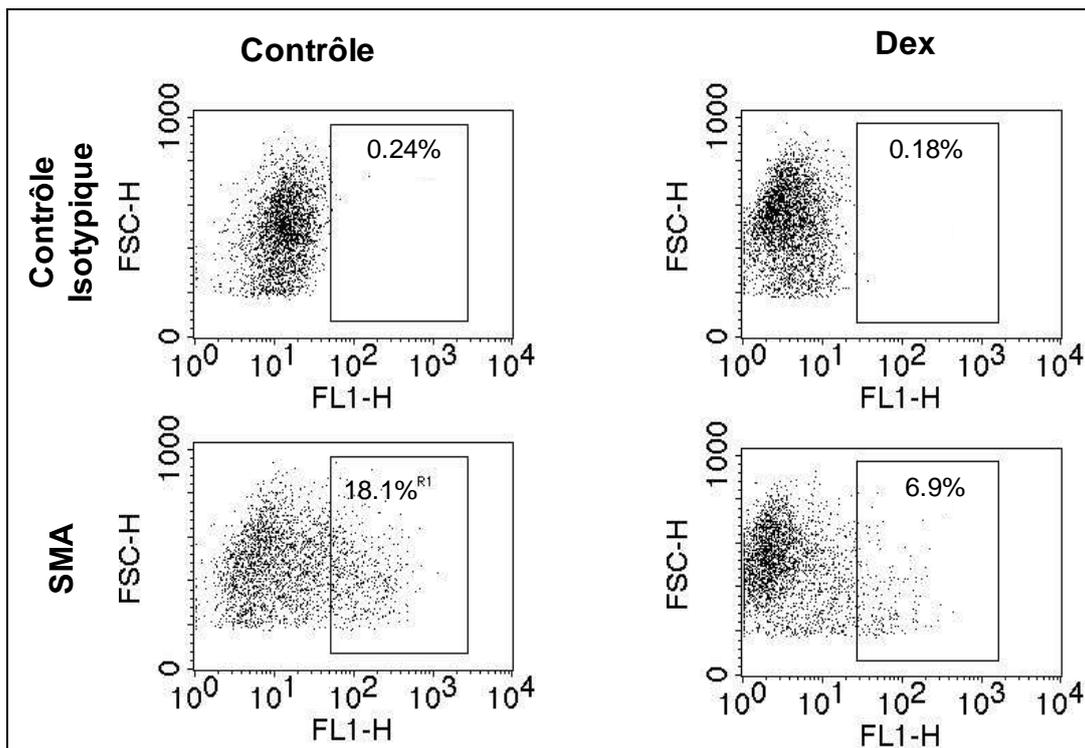


Figure 2.9 : Effet de la Dex sur le pourcentage de cellules SMA+ analysé par FACS après 4 jours de culture en présence de 10^{-8} M de Dex ou de son véhicule. Le résultat d'une expérience représentative est montré (n=3). Le chiffre dans le cadre représente le pourcentage de cellules positives.

Pour mesurer l'effet de la Dex sur le pourcentage de péricytes nous avons utilisé le marqueur intracellulaire SMA. L'étude par FACS du pourcentage de cellules SMA+ dans les cultures avec ou sans Dex montre que ce glucocorticoïde induit une forte diminution (x2,6) du pourcentage de cellules SMA+ en comparaison au contrôle après 4 jours de culture (cellules au 3^{ème} passage) (Fig.2.9).

b) Les cellules souches STRO-1+

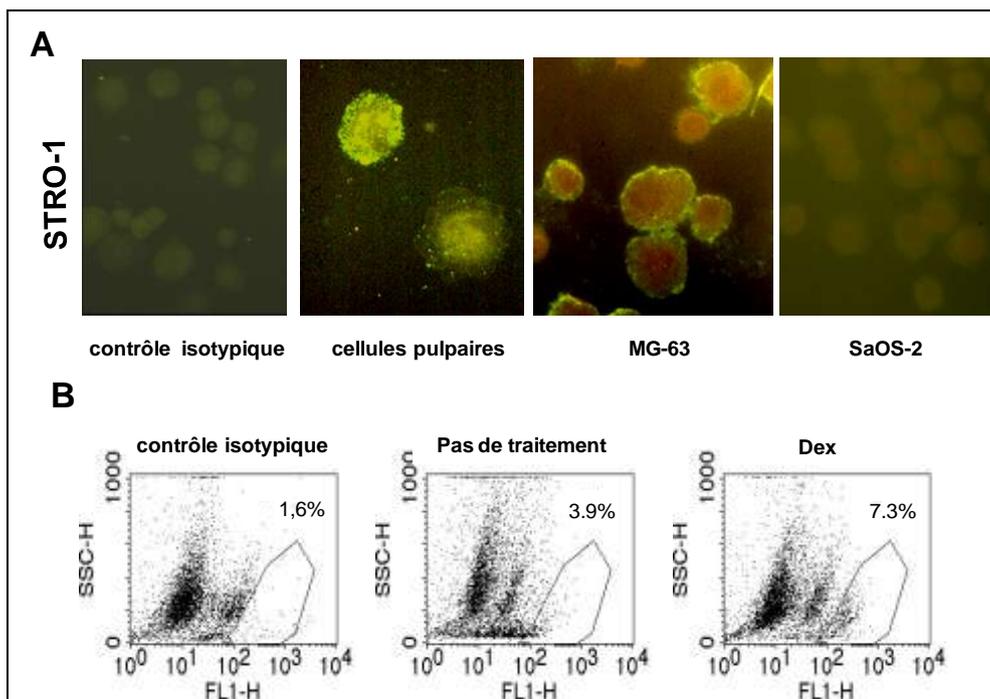


Figure 2.10 : Expression de STRO-1 dans des cultures de cellules pulpaire humaines. **A :** Immunomarquages de STRO-1 sur des cellules pulpaire humaines. Les cellules MG-63 et SaOS-2 sont utilisées respectivement comme contrôle positif et négatif. Grossissement initial x400. **B :** Analyse par FACS de l'effet de la Dex sur le pourcentage de cellules STRO-1 +.

STRO-1 est un marqueur de surface des précurseurs ostéoblastiques (Gronthos *et al*, 1994) utilisé comme marqueur des cellules souches. Nous avons donc étudié les effets de la Dex sur le pourcentage de cellules STRO-1 positives après avoir vérifié la spécificité de l'anticorps. Les immunomarquages réalisés à J14, mettent en évidence la présence de cellules STRO-1+ dans les cultures de cellules pulpaire humaines (Fig. 2.10 A). Les cellules ostéoblastiques MG-63 sont utilisées comme contrôle positif et la lignée ostéoblastique SaOS-2 est utilisée comme contrôle négatif (Stewart *et al*, 1999).

L'analyse par FACS à J14, montre une faible quantité de cellules STRO-1+ dans les cultures de cellules pulpairees en milieu standard. La Dex induit une augmentation par 2 du pourcentage de cellules STRO-1+ faisant clairement apparaître une population de cellules positives (Fig 2.10 B).

Afin de vérifier que la Dex agit sur les précurseurs comme inducteur de la différenciation odontoblastique ou ostéoblastique, nous avons étudié les effets de ce glucocorticoïde sur l'activité ALP et sur l'expression de marqueurs de différenciation.

2.4.2.3. Effet de la Dex sur la différenciation cellulaire

a) Phosphatase alcaline

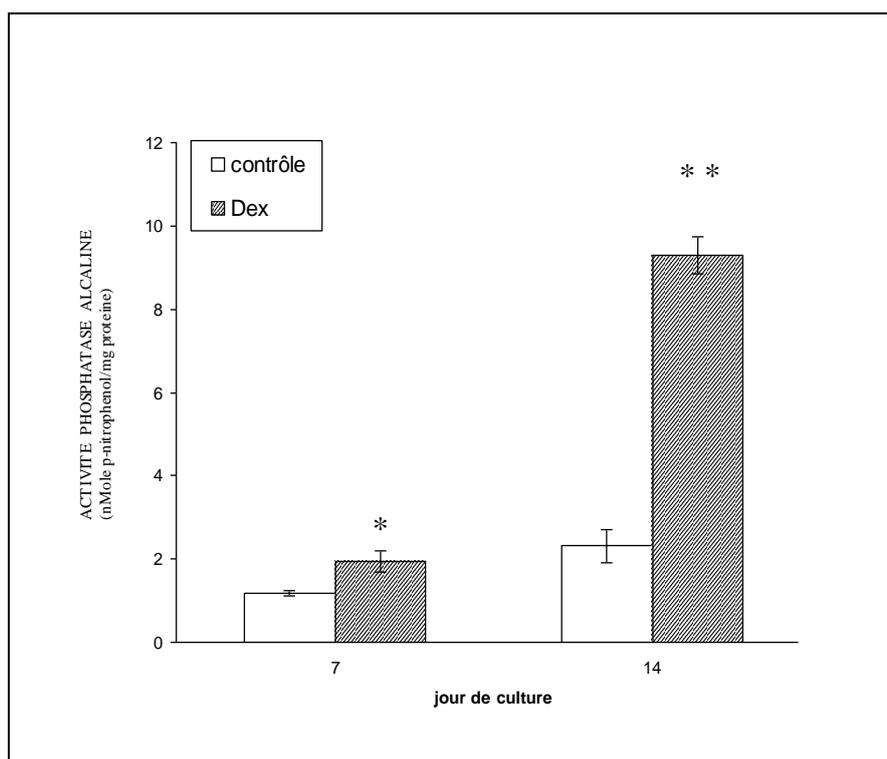


Figure 2.11 : Effet de la Dex sur l'activité phosphatase alcaline des cellules pulpairees humaines. Les cellules sont cultivées avec de la Dex ($10^{-8}M$) ou son véhicule et l'activité ALP est mesurée après 7 et 14 jours de culture. Les valeurs représentent la moyenne d'expérimentations réalisées en triplicata \pm SEM. Les résultats d'une expérimentation représentative sont décrits. (* $p < 0,05$, ** $p < 0,005$ comparé au contrôle).

Pour évaluer le potentiel inducteur de la Dex sur la différenciation des cellules de la pulpe dentaire humaine nous avons étudié dans un premier temps l'activité phosphatase alcaline. L'activité ALP dans les conditions contrôle augmente entre J7 et J14 mais reste basse. L'activité ALP des cellules pulpaire humaines est fortement stimulée par la Dex : l'activité ALP est multipliée par 2 à J7 et cette stimulation est maximale à J14 avec une activité ALP multipliée par 5 (Fig. 2.11).

b) Marqueurs de différenciation

Pour compléter l'étude de l'effet de Dex sur la différenciation cellulaire, nous avons étudié le niveau d'expression de différents marqueurs ostéoblastiques/odontoblastiques et adipocytaires.

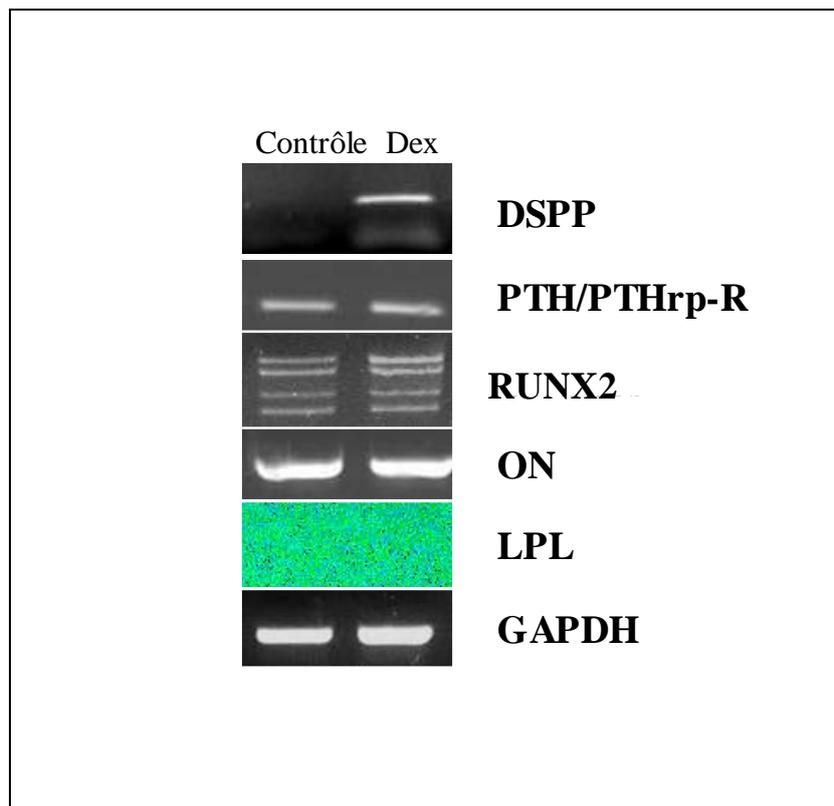


Figure 2.12 : Effet de la Dex sur l'expression des transcrits de la dentine sialophosphoprotéine (DSPP), du récepteur à l'hormone parathyroïde/ protéine apparentée à la PTH (PTH/PTHrp), de RUNX2, de l'osteonectine (ON), de la lipoprotéine lipase (LPL) dans des cultures de cellules pulpaire humaines (la GAPDH est utilisé comme gène de référence). Les cellules sont cultivées pendant 14 jours avec ou sans Dex. Un gel d'agarose représentatif est montré.

Conformément aux cultures de cellules pulpaire en RPMI à 14 jours de culture, nos résultats de RT-PCR montrent que nos cellules dans les conditions contrôle expriment les transcrits de plusieurs marqueurs de différenciation ostéo/odontoblastiques : PTH/PTHrp-R, RUNX2 et ON mais n'expriment pas DSPP (un des principaux marqueurs de différenciation odontoblastique) ni LPL (utilisé comme marqueur des précurseurs adipocytaires).

Nos résultats montrent, pour la première fois, que la Dex induit l'expression du transcrit de la DSPP (Fig. 2.12), confirmant le pouvoir inducteur de la différenciation odontoblastique de la Dex sur les cellules pulpaire.

2.5. Discussion et Conclusions

Depuis quelques années, l'ingénierie tissulaire à partir des cellules adultes pulpaire semble avoir un potentiel clinique prometteur. Des cellules souches ont été identifiées dans la pulpe dentaire et ces cellules sont capables de se différencier en différents types cellulaires : odontoblastes, ostéoblastes, chondrocytes, adipocytes, cellules neuronales L'isolation et l'amplification de ces cellules souches *in vitro* mais aussi leur différenciation permettront de mieux comprendre les mécanismes de réparation dentinaire et de développer de nouvelles approches thérapeutiques notamment la régénération complète de l'organe dentaire. Les nombreux travaux publiés ces dernières années sur les cellules souches dentaires et leur potentiel de différenciation témoignent de l'engouement de plusieurs équipes de recherche sur cette thématique.

Les cultures primaires de cellules pulpaire sont constituées d'une population cellulaire hétérogène : plusieurs types cellulaires et différents stades de différenciation d'un même type cellulaire coexistent (Panagakos *et al*, 1998). Les conditions de culture ont une influence sur les sous-populations cellulaires en présence (Nakashima *et al*, 1991) et l'expression d'un phénotype cellulaire particulier dépend du matériel biologique utilisé, de sa manipulation mais également des conditions de culture (Coelho *et al*, 2000a et b). Il semble donc intéressant d'observer les éventuels effets du milieu de culture sur les cellules pulpaire humaines. Afin de déterminer les conditions de cultures favorables au recrutement, à la croissance et à la différenciation des cellules souches, nous avons donc dans un premier temps décidé de tester deux milieux de culture : le RPMI 1640 (milieu utilisé jusqu'alors pour la

mise au point du modèle cellulaire) et le MEM (milieu le plus couramment utilisé pour la culture des cellules pulpaire).

Dans notre modèle cellulaire, quel que soit le milieu, en fonction du donneur, de grandes variations du nombre de cellules sont observées en primoculture. Ces variations ne semblent pas liées au sexe, à l'âge ou au stade d'édification radulaire. Ces résultats sont en accord avec les travaux de Moule (1995) qui a montré que la variabilité de prolifération cellulaire ne pouvait pas être imputée à l'âge du donneur (âgé de 17 à 68 ans). D'autres facteurs que le milieu influence la prolifération des cellules en primoculture. Afin de limiter les effets de ces autres facteurs, nous avons standardisé notre protocole. Les cellules sortent des explants plus ou moins vite. Les explants ont été retirés non pas en fonction du nombre de jours de culture mais en fonction de la densité cellulaire autour des explants.

Dans notre étude les comptages cellulaires et l'incorporation de Thymidine tritiée montrent que les cellules pulpaire humaine prolifèrent plus vite et de façon plus importante lorsque les cellules sont cultivées dans du MEM par rapport au RPMI. Au fur et à mesure des passages, la prolifération cellulaire diminue et l'écart de prolifération entre les deux milieux de culture s'atténue. Nos résultats sont en accord avec la littérature. En effet, l'influence du milieu de culture sur la prolifération cellulaire des cellules pulpaire a été largement décrite. Pissiotis et Spangberg (1993) préconisent l'emploi du MEM en se basant sur des courbes de croissance sur une période de 10 jours. Ils observent une prolifération cellulaire plus importante en MEM par rapport aux DMEM, MCDB-104, F12, Leibovitz L-15, McCoy's 5A, M199, α -MEM et au BGJ_b. Dans une autre étude, le DMEM permet une meilleure prolifération sur les cellules pulpaire que le RPMI (Nakashima, 1991).

La différence majeure entre le MEM et le RPMI étant la concentration en calcium et en phosphate, cette différence de composition pourrait expliquer nos résultats.

Une étude de Maeno en 2005 montre qu'une concentration de Calcium comprise entre 0 et 4 mM augmente la prolifération de cellules ostéoblastiques (Maeno *et al*, 2005). La concentration de calcium pourrait donc jouer un rôle dans la différence de prolifération observée dans notre modèle en fonction du milieu de culture. Pour vérifier cette hypothèse, il faudrait cultiver des cellules en RPMI en ajoutant du calcium et observer si l'écart de prolifération diminue.

Parallèlement à la prolifération cellulaire, nous nous sommes intéressés aux populations cellulaires en présence et à la formation de nodules.

Dans nos cultures, les observations au microscope à contraste de phase montrent que les populations en présence semblent morphologiquement les mêmes en RPMI et en MEM. Dans aucun des 2 milieux testés, des cellules ayant la morphologie odontoblastique n'ont été observées.

Dans notre étude, la formation de nodules a été observée quel que soit le milieu de culture utilisé et cela sans adjonction de β -glycérophosphate (molécule classiquement utilisée en culture pour induire une minéralisation). Ces nodules apparaissent à partir du 20^{ème} jour de culture en primoculture et dès le 4^{ème} jour lors des passages. Tsukamoto *et al* (1992) observent la formation de nodules après 10 à 15 jours de culture, sans addition de stimulants de la minéralisation. D'autres auteurs décrivent la formation de nodules cependant leur minéralisation n'est observée qu'en présence de β -glycérophosphate ou de Dexaméthasone (Kasugai *et al*, 1993 ; Stanislawski *et al*, 1997 ; Abe *et al*, 2000 ; About *et al*, 2000 ; Couble *et al*, 2000).

La formation des nodules est observée aussi bien en RPMI qu'en MEM mais nous n'avons pas réalisé d'étude spécifique afin de savoir si l'un des deux milieux favorise ce phénomène. En effet, le nombre de nodules est difficilement quantifiable car de nombreuses variations entre les passages et les patients ont été observées. L'analyse d'image permettrait de quantifier le nombre et la surface des nodules ainsi que leur degré de minéralisation (Nefussi *et al*, 1997).

Les colorations Von Kossa (où les ions argent du colorant se substituent au calcium dans les composés phosphocalciques) montrent la présence de minéral dans les nodules et l'analyse des nodules en Spectroscopie Infra Rouge (IR) à Transformée de Fourier indique que le minéral observé est de l'apatite biologique proche de celle observée dans la dentine humaine aussi bien en MEM qu'en RPMI. About et collaborateurs (2000) obtiennent des spectres IR analogues à ceux de la dentine quand du β -glycérophosphate est ajouté dans des cultures de cellules pulpaires issues de dents de sagesse humaines. Sans adjonction de β -glycérophosphate ou de phosphate inorganique, la présence de minéral en culture peut être due soit à une précipitation liée à un phénomène de mort cellulaire (apoptose ou nécrose), soit à la présence de cellules qui permettent le dépôt de cristaux sur une matrice extra-cellulaire bien organisée avec un réseau de fibres de collagène (Nancy *et al*, 1996). Parmi les cellules aptes à minéraliser spontanément, les myofibroblastes ou péricytes ont largement été décrits. Dans nos cultures, la formation des nodules est précédée d'une rétraction cellulaire et de la formation de zones multicellulaires. Or la formation de nodules dans des cultures de péricytes se produit de façon similaire (Canfeld *et al*, 2000). En effet, l'étude de la littérature montre

que les péricytes sont des cellules pluripotentes qui ont le potentiel de se différencier notamment en ostéoblastes (Brighton *et al*, 1992 ; Diaz-Flores, 1992 ; Doherty, 1999 ; Canfield, 2000). Les péricytes isolés à partir de la rétine de bovin sont capables en culture de former des nodules, après confluence, par rétraction cellulaire et formation de zones multicellulaires (Schor *et al*, 1990 ; Brighton *et al*, 1992 ; Canfield, 2000). Ces nodules vont minéraliser 7 à 15 jours après leur formation (équivalent à 15 à 30 jours de culture) lorsque les cellules sont cultivées en MEM sans apport exogène de phosphate. Ce phénomène peut être accéléré et augmenté par l'adjonction de β -glycérophosphate ou de Dexaméthasone (Schor *et al*, 1990 ; Canfield, 2000). Dans nos cultures la formation spontanée de nodules aptes à minéraliser sans ajout de phosphate inorganique ou de Dex quelque soit le milieu de culture utilisé (MEM ou RPMI) nous a conduit à rechercher la présence de péricytes dans nos cultures.

Les péricytes sont caractérisés par un élément de leur cytosquelette, l'alpha actine du muscle lisse (SMA) et des marqueurs spécifiques tels que CD146 et 3G5. Notre laboratoire a été dans les tous premiers à mettre en évidence la présence de cellules SMA+ dans des cultures de cellules pulpaires humaines (Gronthos *et al*, 2000, et 2003 ; Alliot-Licht *et al*, 2001). Des péricytes ont aussi été observés dans des cultures de cellules pulpaires porcines (Brock *et al*, 2002). Les immunomarquages réalisés dans notre étude montrent la présence de cellules SMA+ dans nos cultures aussi bien en MEM qu'en RPMI, dans les primocultures ainsi qu'au cours des différents passages. Ces cellules sont observées soit isolées, soit regroupées ou soit en amas autour des nodules, quel que soit le milieu de culture.

Afin de quantifier le pourcentage de cellules SMA+ par rapport à la population cellulaire totale, nous avons utilisé la Cytométrie en flux. Nos résultats montrent que le milieu de culture a une influence sur le pourcentage de cellules SMA+. Le pourcentage de cellules SMA+ est plus important dans des cultures en MEM par rapport au RPMI. Le MEM semble favoriser la différenciation et/ou la prolifération des cellules SMA+. Le RPMI au contraire induit une diminution des cellules SMA+. Il peut y avoir, soit une diminution de la prolifération des cellules SMA+, soit une diminution de la différenciation en cellules SMA+, soit les cellules SMA+ se différencient en d'autres types cellulaires.

En effet, les péricytes sont issues de cellules indifférenciées qui acquièrent l'expression de SMA, puis les péricytes qui se différencient en ostéoblastes perdent leur marquage α actine du muscle lisse parallèlement à l'augmentation de l'expression de marqueurs ostéoblastiques (Brighton *et al*, 1992). Parmi ces marqueurs nous sommes intéressés à STRO-1. Cet

antigène de surface est couramment utilisé comme marqueur précoce des cellules souches préostéogéniques, son expression étant progressivement perdue au cours de la différenciation en ostéoblaste mature (Stewart *et al*, 1999; Gronthos *et al*, 1999). Sur des coupes de pulpe humaine, l'expression de STRO-1 a été décrite avec une restriction de la localisation autour des vaisseaux sanguins et des paquets nerveux (Shi et Gronthos, 2003). Une colocalisation de STRO-1 et CD146 (marqueur des péricytes) dans le tissu pulpaire permet de conclure que la niche de cellules souches pulpaires est paravasculaire (Shi et Gronthos, 2003). La fraction de cellules STRO-1+ obtenue par tri cellulaire représentant approximativement 6% de la population totale des cellules pulpaires (Shi et Gronthos, 2003) et 9% des cellules souches issues de dents temporaires exfoliées (Miura *et al*, 2003) mais sa présence dans des cultures de cellules pulpaires n'avait jamais été mise en évidence. Nos résultats mettent en évidence, la présence de cellules STRO-1+ dans des cultures de cellules pulpaires humaines. Cependant, l'analyse par FACS permet de constater que la proportion de cellules STRO-1+ qui ne dépasse pas 8% de la culture est fortement dépendante du donneur et du nombre de passage effectué (résultat non montré).

Depuis nos travaux, un nombre croissant d'études a porté sur les cellules STRO-1 positives. Dans notre modèle cellulaire, il y a donc des cellules STRO-1 positives et en présence de MEM la proportion de cellules SMA+ est plus importante. Le MEM favorise-t-il la différenciation cellulaire ?

Afin d'étudier l'effet du milieu de culture sur la différenciation cellulaire, nous avons mesuré l'activité phosphatase alcaline. L'ALP est une enzyme qui fournit les ions phosphates utilisés au cours de la minéralisation. Parmi les trois isotypes décrits, la forme tissulaire non spécifique (rein-foie-os) est retrouvée au niveau de la pulpe (Goseki *et al*, 1990 ; San Miguel *et al*, 1999). L'ALP non spécifique est considérée comme un marqueur des cellules impliquées dans la minéralisation comme les odontoblastes et les ostéoblastes, mais son rôle exact dans la minéralisation n'est pas encore complètement élucidé. Les cellules pulpaires humaines dans notre modèle expriment l'ALP avec une augmentation de l'activité à J14, quel que soit le milieu de culture utilisé. La confluence cellulaire est alors atteinte et des nodules apparaissent. Ce résultat est semblable à ceux décrits par Nakashima en 1991, Onishi *et al* en 1999 et Stanilawsky *et al* en 1997. Cependant, le MEM induit une plus forte activité ALP à J14 en comparaison avec le RPMI.

Pour savoir si l'augmentation de l'activité ALP est en relation avec une différenciation odontoblastique ou ostéoblastique, nous avons étudié par RT-PCR l'expression de différents

marqueurs. Le milieu de culture ne semble pas avoir d'influence sur l'expression de deux marqueurs exprimés aussi bien par les ostéoblastes et par les odontoblastes : l'ostéonectine et PTH/PTHrp-receptor. D'autre part, nous nous sommes intéressés à l'expression de DSPP, qui même si il est exprimé en faible quantité dans l'émail et l'os (Qin *et al*, 2002), est considéré comme un des marqueurs odontoblastiques majeurs. Nos résultats montrent que le transcrit de DSPP est exprimé lorsque les cellules sont cultivées en MEM contrairement au RPMI où l'expression de DSPP n'est pas détectée. Nous pouvons donc en déduire que seul le milieu MEM semble induire la différenciation odontoblastique en culture. Cependant, en accord avec Shi *et al* (2001), notre étude ne permet pas de déterminer si la majorité des cellules expriment ces marqueurs ou si leur expression est restreinte à une sous-population spécifique présente dans nos cultures.

En conclusion le milieu de culture a une influence sur la prolifération et la différenciation des cellules pulpaire humaines et sur le pourcentage de cellules souches. Les cellules pulpaire cultivées en MEM prolifèrent plus, contiennent plus de cellules SMA positives et contiennent des cellules différenciées en odontoblaste. Le RPMI semble cependant plus intéressant pour étudier l'effet de facteurs exogènes sur la différenciation cellulaire et sur le recrutement des péricytes dans notre modèle.

Dans un deuxième temps, nous nous sommes intéressés à l'effet d'un glucocorticoïde, la dexaméthasone.

De nombreuses études ont montré que la Dex induit la différenciation d'ostéoprogéniteurs dans des modèles de cultures de cellules osseuses (Kim *et al*, 1999), de péricytes (Brighton *et al*, 1992) et de cellules du muscle lisse vasculaire (Mori *et al*, 1999). Cependant, malgré le fait que les cellules pulpaire requièrent l'addition de facteurs exogènes tel que le β -glycérophosphate, l'acide ascorbique et/ou la Dex dans le milieu de culture pour induire la minéralisation (Gronthos *et al*, 2000; Couble *et al*, 2000; Miura *et al*, 2003), les effets spécifiques de la Dex sur les cellules pulpaire n'avaient jamais été étudiés.

Dans cette étude, nous avons observé une inhibition de la prolifération cellulaire sous traitement à la Dex. Les comptages cellulaires ont confirmé la diminution de l'incorporation de thymidine tritiée sous Dex et n'ont pas mis en évidence d'augmentation de la mortalité

cellulaire. Un effet inhibiteur de la Dex sur la prolifération a précédemment été décrit sur des cultures de cellules osseuses (Kim *et al*, 1999; Walsh *et al*, 2001; Beresford *et al*, 1994) et sur des cellules du muscle lisse vasculaire (Mori *et al*, 1999).

Les glucocorticoïdes sont connus pour stimuler la prolifération des cellules différenciées en ostéoblastes mais pour inhiber la prolifération des précurseurs (Bellows *et al*, 1990). Considérant que nos cultures sont hétérogènes, il est possible, comme le prétendent Bellow *et al*, (1990), que la Dex inhibe la prolifération des cellules souches présentes dans nos cultures de cellules pulpaire humaines.

Nous avons donc étudié les effets de la Dex sur deux marqueurs de cellules souches pulpaire les plus souvent utilisés : SMA et STRO-1.

Considérant que, dans nos cultures, les cellules qui expriment l'alpha-actine du muscle lisse (SMA+) identifiées comme péricytes (Alliot-Licht *et al*, 2001) pourraient être des précurseurs ostéo-odontoblastiques (Gronthos *et al*, 2000; Shi et Gronthos 2003) et à la vue d'études qui décrivent que les péricytes en cultures perdent l'expression de SMA dans des conditions qui favorisent la minéralisation, l'hypoxie (Brighton *et al*, 1992) et l'ajout de β -glycérophosphate (Steitz *et al*, 2001), nous avons étudié par FACS, l'effet de la Dex sur l'expression de SMA. Cette étude met en évidence que la Dex provoque une forte diminution de la proportion de cellules SMA+ dans les sous-cultures de cellules pulpaire humaines. En accord avec la littérature (Brighton *et al*, 1992), nous proposons l'hypothèse que les péricytes pulpaire perdent leur phénotype SMA+ en se différenciant en cellules odontoblastiques et/ou osteoblastiques. Cependant, du fait de la nature hétérogène des cultures de pulpes dentaires (Gronthos *et al*, 2000) et de la complexité de l'action des glucocorticoïdes (Beresford *et al*, 1994), d'autres études doivent être réalisées pour déterminer si la diminution de la quantité de cellules SMA+ est due à un effet direct de la Dex sur les péricytes ou à un changement des conditions de culture telles que la densité cellulaire, les synthèses d'éléments matriciels ou de facteurs de croissance. Ces paramètres sont en effet connus pour influencer l'expression de l' α -actine du muscle lisse *in vitro* (Schor *et al*, 1995; Doherty et Canfield 1999; Shepro et Morel, 1993).

Le deuxième marqueur des cellules souches pulpaire auquel nous nous sommes intéressés est STRO-1. Dans cette étude, nous montrons que la Dex augmente considérablement la proportion de cellules STRO-1+. Un effet similaire de la Dex a été montré dans des cultures de cellules stromales de moelle osseuse. En effet, par FACS il a été rapporté que la Dex

augmente la proportion de cellules STRO-1⁺/ALP⁻ (ostéoprogéniteurs) puis la proportion de cette population décline alors qu'augmente la proportion de cellules STRO-1⁺/ALP⁺ (préostéoblastes) suivit enfin par une augmentation des STRO-1⁻/ALP⁺ (ostéoblastes matures) (Stewart *et al*, 1999; Walsh *et al*, 2000). A la vue de nos résultats, nous suggérons que la Dex soit induit l'expression de STRO-1 dans les cellules pulpaire soit augmente leur prolifération.

Comme nous l'avons vu précédemment, la Dex est souvent utilisée pour augmenter la différenciation odontoblastique et ostéoblastique en culture. Nous avons donc étudié l'activité phosphatase alcaline qui est un marqueur de différenciation des cellules minéralisantes. En accord avec les études qui démontrent une relation de couplage fonctionnel et réciproque entre la prolifération et la différenciation cellulaire, dans cette étude, le traitement à la Dex provoque une augmentation significative de l'activité phosphatase alcaline (ALP). L'effet stimulateur de la Dex sur l'ALP a déjà été décrit sur des cellules stromales de moelles osseuses (Kim *et al*, 1999; Beresford *et al*, 1994), sur des cellules de papille dentaire (Hao *et al*, 1997), sur des cellules du muscle squelettique (Levy *et al*, 2001) et sur des cellules du muscle lisse vasculaire (Mori *et al*, 1999) alors que la Dex n'a pas d'effet sur les fibroblastes gingivaux (Kuru *et al*, 1999). En accord avec la littérature, nous pouvons supposer que l'augmentation de l'ALP signifie que la Dex induit une différenciation odontoblastique dans nos cultures. Un double marquage STRO-1/ALP nous permettrait, comme sur les cellules de la moelle osseuse, d'analyser l'effet dans le temps de la Dex sur les différentes sous-populations.

Pour vérifier l'hypothèse de pouvoir inducteur de la Dex sur la différenciation ostéoblastique ou odontoblastique, nous avons étudié les effets de la Dex sur l'expression de marqueurs spécifiques à l'échelle transcriptionnelle.

Sous stimulation à la Dex, le niveau d'expression des transcrits du récepteur à la PTHR/PTHrp, de l'ON et du RUNX2 reste inchangé. Ces résultats sont en accord avec des études préalables montrant sur des cellules stromales de moelle osseuse, que la Dex n'a pas d'effet sur l'expression d'ARNm codant pour le récepteur à la PTHR/PTHrp (Walsh *et al*, 2001), mais sont opposés à la stimulation de RUNX2 sous Dex décrite sur des cellules souches de dents temporaire exfoliées (Miura *et al*, 2003), sur des cellules musculaires lisses vasculaires (Mori *et al*, 1999) et sur des cellules du muscle lisse aortique (Steitz *et al*, 2001).

Il est possible que nos conditions de cultures (comme l'absence de L-ascorbate-2-phosphate et de phosphate inorganique) puissent expliquer ces résultats divergents.

En ce qui concerne l'expression du transcrite du gène DSPP, nous n'avons amplifié aucun ARNm en absence de Dex. Ce résultat est en accord avec la littérature qui ne montre jamais d'expression de DSPP en absence de conditions spécifiques induisant la minéralisation (Miura *et al*, 2003; Couble *et al*, 2000; Shi et Gronthos 2003). L'expression du gène DSPP dans les odontoblastes matures, concomitante avec le début de la minéralisation de la dentine, est un marqueur de la différenciation terminale des odontoblastes. Dans notre étude, l'observation de l'expression du transcrite du gène DSPP sous Dex permet de montrer que la Dex induit la différenciation odontoblastique dans les cultures de cellules pulpaire humaines. Les cellules pulpaire contiennent des cellules souches capables de se différencier en différents types cellulaires (dont en odontoblastes, en ostéoblastes, en cellules nerveuses et en adipocytes). Pour évaluer le potentiel de nos cellules à se différencier en adipocytes, nous avons observé l'expression d'un marqueur précoce de la différenciation adipocytaire (la LPL). Contrairement aux cellules souches de moelle osseuse sur lesquelles la Dex induit l'expression de LPL (Gronthos *et al*, 2000), nous n'avons pas observé d'expression de LPL dans les cultures de cellules pulpaire humaines en présence de Dex. Cette absence d'expression du gène de la LPL avec ou sans Dex dans les cellules pulpaire humaines est en accord avec la littérature (Gronthos *et al*, 2000).

En résumé, dans notre modèle de cellules pulpaire, la Dex diminue la prolifération cellulaire, augmente le pourcentage de cellules STRO-1+ et diminue le pourcentage de cellules SMA+, augmente l'activité ALP et induit l'expression du transcrite de la DSPP. La Dex induit donc la différenciation odontoblastique dans les cultures de pulpe dentaire humaine. Cependant, notre étude ne permet pas de savoir si l'augmentation des cellules STRO-1+ peut être corrélée à la diminution des SMA+.

La Dex permet d'augmenter la proportion de cellules STRO-1 +, cellules souches potentiellement très importante pour la thérapie cellulaire

En conclusion, l'ensemble de ces travaux montre que les conditions de culture (milieux de culture et adjuvants comme la Dex) ont une influence sur la prolifération et la différenciation

des cellules pulpairees humaines et sur le recrutement des cellules souches de la pulpe dentaire. Ce travail contribue donc à améliorer nos connaissances sur les cultures de pulpe dentaire dans le but d'optimiser les conditions de culture pour la thérapie cellulaire. De plus cette étude apporte des éléments sur le recrutement et la différenciation en odontoblastes des cellules souches dans le cadre de la réparation dentinaire.

III. Deuxième partie expérimentale

Effet de l'hormone de croissance sur
une lignée d'odontoblastes : les
M2H4

3.1. Généralités sur l'hormone de croissance

3.1.1. Synthèse, sécrétion et mécanismes d'action

L'hormone de croissance (GH) est synthétisée par les cellules somatotropes hypophysaires. Ces cellules acidophiles hypophysaires sont situées sur les parties latérales de l'adénohypophyse (partie antérieure de l'hypophyse) et constituent le pool cellulaire le plus important (40%).

La GH est également synthétisée par d'autres tissus comme le placenta ou le cerveau, suggérant une transcription ubiquitaire de la GH (Harvey et Hull, 1997).

Chez l'homme les cellules somatotropes synthétisent deux variants de GH, codé par un seul gène, comportant 5 exons et 3 introns et situé sur le bras long du chromosome 17 :

- La forme longue, majoritaire, est un polypeptide de 22 kDa constitué de 191 acides aminés formant une seule chaîne polypeptidique comportant deux ponts disulfures,
- La forme courte, minoritaire (10%), est un polypeptide de 20 kDa constitué de 176 acides aminés, résultant d'un épissage alternatif de l'exon 3.

L'expression du gène de la GH est sous le contrôle de Pit-1 (pituitary-specific transcription factor-1) au niveau hypophysaire (Tuggle et Trenkle, 1996 ; Gahete *et al*, 2009) et également dans les autres tissus (Harvey *et al*, 1997). Dans les cas de mutations de Pit-1 une déficience de la synthèse de GH est décrite (Pfäffle *et al*, 1999).

La sécrétion de la GH par l'adénohypophyse est pulsatile (un épisode sécrétoire toutes les 3-4 heures) et est influencée par différents facteurs (Hennen, 2001) :

- L'âge : la sécrétion de GH est importante au début de la vie et à la puberté puis diminue avec l'âge. Chez l'homme âgé, la sécrétion quotidienne de GH représente 1/5 à 1/20 de celle d'un adulte jeune (Giustina *et al*, 2008),
- Les hormones stéroïdiennes sexuelles et thyroïdiennes stimulent la sécrétion de GH,
- La sécrétion nocturne de la GH est plus importante avec des pics nocturnes à l'endormissement,

- Le stress, l'hypoglycémie, les agonistes α adrénergiques, la dopamine, l'acétylcholine et le glucagon augmentent la sécrétion de la GH,
- Certaines pathologies comme l'obésité et l'hypothyroïdie diminuent la sécrétion de la GH.

La sécrétion de la GH est soumise à un contrôle neuroendocrinien. Plusieurs facteurs sont en effet impliqués dans cette régulation (Gahete *et al*, 2009) :

- La GHRH (Growth Hormone-Releasing Hormone) ou somatolibérine est sécrétée par l'hypothalamus. Elle agit par l'intermédiaire de son récepteur membranaire (le GHRH-R, couplé à la protéine G) en stimulant à la fois la sécrétion de GH et la prolifération des cellules somatotropes,
- La SRIF (Somatotropine Releasing-Inhibiting Factor) ou somatostatine est sécrétée par l'hypothalamus. Elle inhibe la sécrétion de GH. La SRIF est stimulée par la GHRH,

La GH agit par rétrocontrôle sur ces deux facteurs hypothalamiques : si la quantité de GH augmente, la GH stimule la SRIF. Si la quantité de GH diminue, la GH stimule la GHRH.

- La Ghrelina est une protéine synthétisée au niveau du tractus gastro-intestinal. Elle agit sur l'hypothalamus et les cellules somatotropes en stimulant la sécrétion de la GH (Takaya *et al*, 2000).

La sécrétion de la GH est également régulée par l'IGF1 (Insuline-like Growth Factor 1). IGF1 est produit, sous le contrôle de la GH, essentiellement dans le foie mais aussi dans d'autres tissus comme le tissu osseux. IGF1 agit par rétrocontrôle négatif sur la sécrétion de GH par les cellules somatotropes et en stimulant la SRIF (Giustina *et al*, 2008).

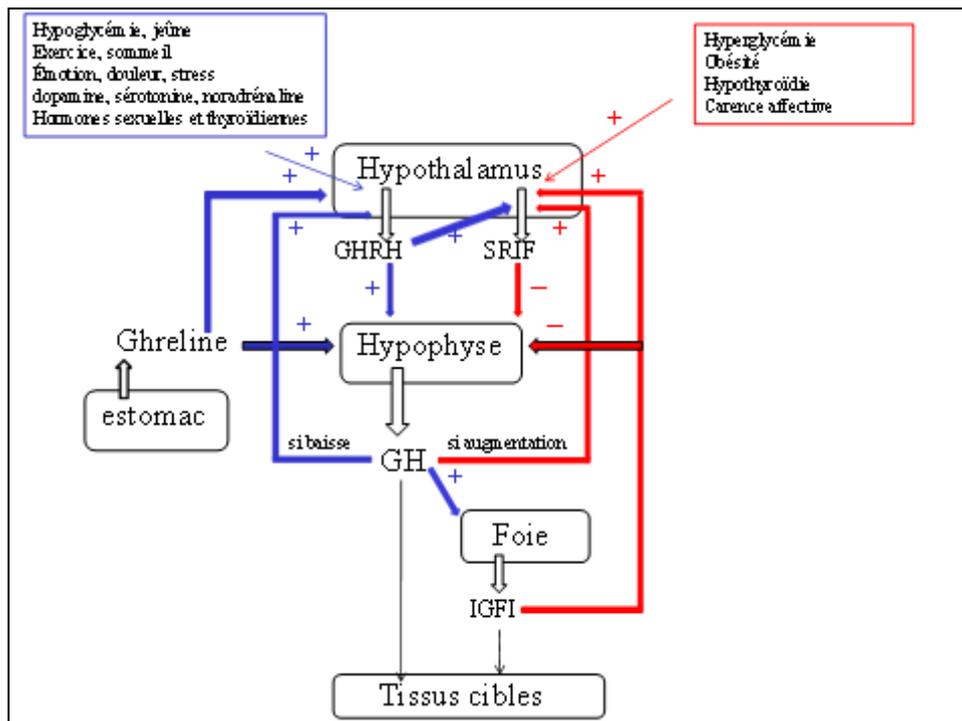


Figure 3.1: Régulation de la sécrétion de la GH

Après sécrétion, la GH est transportée dans le sang vers les tissus/cellules cibles.

Dans le sang 50% de la GH est présente sous forme libre en monomères, dimères ou oligomères qui peuvent être des homo ou des hétéromères des deux variants de la GH. La GH circule également liée à des GHBP (Growth Hormone Protein Binding) (Baumann G, 2001).

Sur les cellules cibles, la GH agit après fixation à son récepteur transmembranaire spécifique (GHR). Le GHR appartient à la super famille des récepteurs de type cytokine-hématopoïétine. L'interaction de la GH avec le domaine extracellulaire du GHR induit une dimérisation du récepteur. Cette dimérisation entraîne l'activation d'une tyrosine kinase associée au GHR : la Janus Kinase 2 (JAK2). JAK2 activée assure alors la phosphorylation de résidus tyrosine du GHR et de facteurs transcriptionnels de type STAT (Signal Transducers and Activators of Transcription) : STAT1, STAT3 et les deux formes de STAT5. JAK2 est aussi impliquée dans l'activation par la GH des sérines/thréonines kinases de la famille MAPK/ERK : ERK 1 et 2 et du phosphatidylinositol 3' kinase (PI3K). Les protéines phosphorylées vont ensuite se fixer au niveau de l'ADN nucléaire et induire différents effets cellulaires (prolifération, synthèse protéique) (Zhu *et al*, 2001 ; Pwien-Pilipuk *et al*, 2002 ; Lichanska et Waters, 2008).

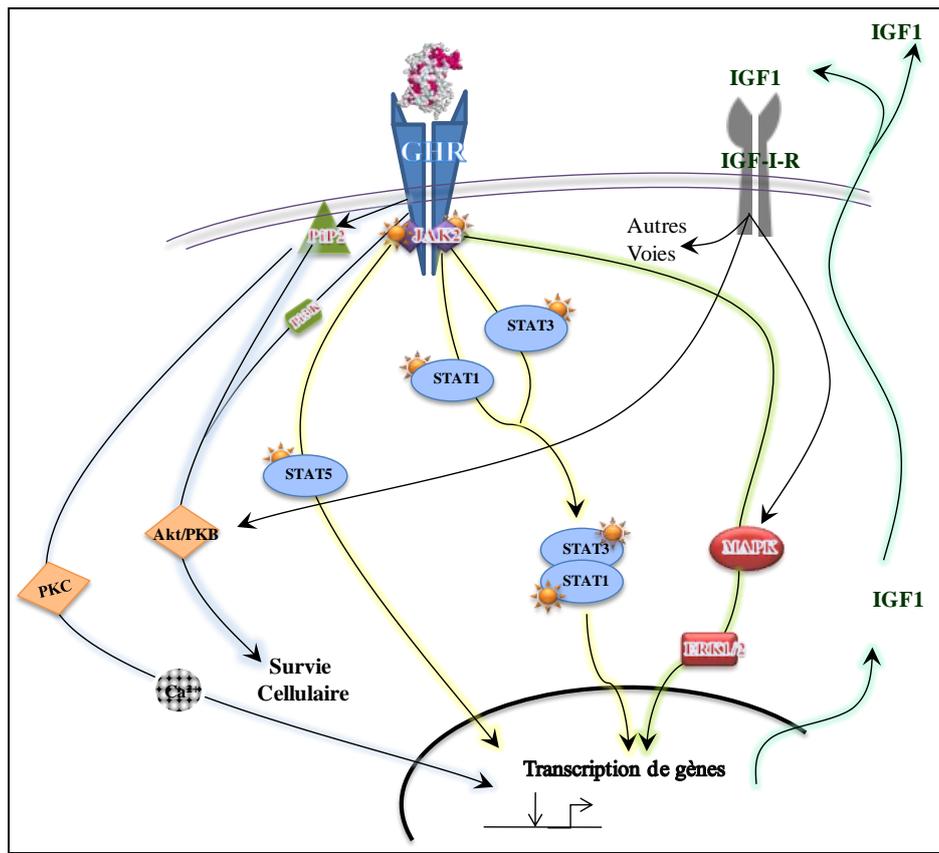


Figure 3.2: Mécanisme d'action de l'hormone de croissance.

L'action de la GH sur les cellules cibles est directe et/ou indirecte via l'Insuline Growth Factor 1 (IGF1). Une partie des effets de la GH sont médiés par IGF1.

Comme nous l'avons vu précédemment, la GH induit la production d'IGF1 au niveau du foie mais également dans de nombreux autres tissus périphériques. IGF1 exerce des effets endocrines au niveau des tissus cibles (rôle d'hormone systémique). D'autre part IGF1 agit également par des effets paracrines et autocrines au niveau des cellules cibles (Hennen G, 2001 ; Giustina *et al.*, 2008).

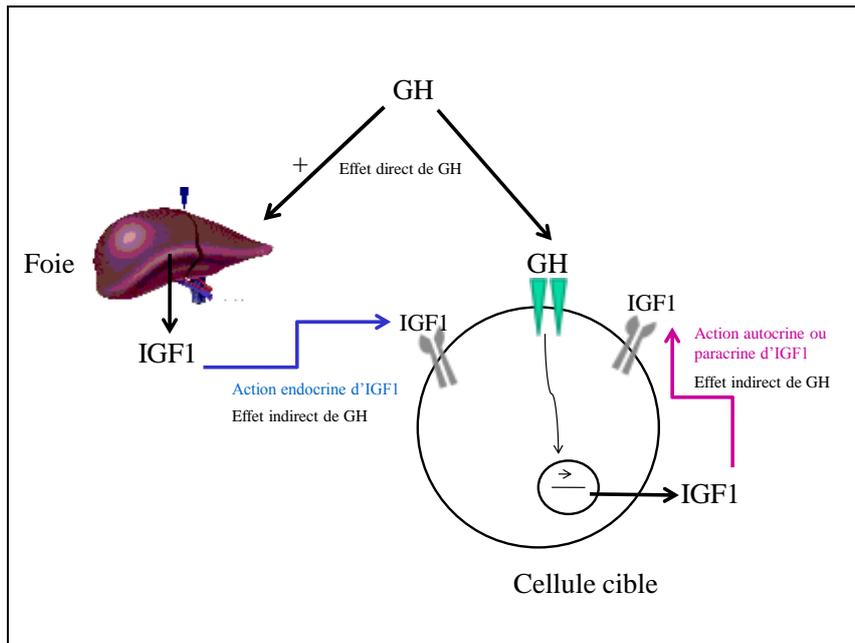


Figure 3.3: Action directe de l'hormone de croissance et indirecte médiée par IGF1.

3.2.2. Rôles

Les effets de la GH sur la croissance osseuse sont largement décrits (pour revue voir Giustina *et al*, 2008). La GH joue un rôle important dans la croissance des os longs. Elle agit sur la plaque de croissance en augmentant la réplication et la maturation des chondrocytes et stimule l'ossification endochondrale. La GH a également un rôle dans le remodelage osseux. Elle agit sur la différenciation des cellules mésenchymateuses en ostéoblastes, active la prolifération des cellules ostéoblastiques, augmente l'expression de différents marqueurs ostéoblastiques et agit sur l'activité ostéoclastique.

La GH joue aussi un rôle dans les métabolismes protéiques, glucidiques et lipidiques (pour revue voir Møller and Jørgensen, 2009). La GH augmente la synthèse protéique et la glycogénolyse, diminue l'absorption de glucose et stimule la lipolyse. La GH est donc également impliquée dans la régulation de la masse musculaire (pour revue voir Velloso, 2008). Elle augmente la synthèse protéique et la prolifération cellulaire d'où une hypertrophie musculaire. Chez les sportifs la GH est considérée comme un produit dopant. Elle est utilisée pour augmenter la masse musculaire et diminuer les tissus gras.

La GH agit sur la lactation (pour revue voir Kelly *et al*, 2002). Chez l'animal La GH est utilisée pour augmenter la production de lait.

La GH intervient également sur la régulation du système immunitaire (pour revue voir Meazza *et al*, 2004). La GH stimule la prolifération des lymphocytes T et B et la synthèse des immunoglobulines. La GH induit la maturation des progéniteurs myéloïdiens et module la réponse aux cytokines.

3.1.3. Pathologies associées à un trouble de sécrétion de GH

a) Déficit

Le nanisme hypophysaire est dû à un déficit en GH. Il peut s'agir :

- d'un déficit isolé correspondant à une maladie héréditaire caractérisée par un retard statural, un retard de l'âge osseux et dentaire et par des anomalies morphologiques (visage).
- d'une absence de sécrétion d'hormone de croissance due à un défaut de commandes de sécrétion hypothalamique.

Le traitement fait appel à l'hormone de croissance.

Le syndrome de Laron est un nanisme avec un taux de GH normal voire élevé. C'est une maladie autosomique récessive caractérisée par une petite taille, un dysfonctionnement des récepteurs de l'hormone de croissance, et une incapacité à produire de l'IGF1. Le syndrome de Laron n'est pas une forme de nanisme liée à un déficit en hormone de croissance, mais il résulte de la mutation du gène GHR sur le chromosome 5.

Le traitement à la GH n'a aucune efficacité.

b) Excès

Le gigantisme constitutionnel (simple et harmonieux) : Il est dû

- à un excès de production précoce de GH, se produisant avant l'âge de la soudure des épiphyses,
- à un déficit génétique entraînant un retard d'ossification au moment de la puberté et la poursuite de la croissance chez l'adulte.

L'acromégalie est le résultat d'une augmentation de la sécrétion d'hormone de croissance par l'hypophyse. Cette augmentation de la sécrétion est en règle secondaire à une tumeur bénigne de l'hypophyse (adénome de l'hypophyse) mais la tumeur peut être extra hypophysaire.

3.2. Intérêt de l'étude

Sur le métabolisme osseux, la GH intervient dans la synthèse de la matrice extracellulaire par les ostéoblastes et dans la régulation de la résorption ostéoclastique. Plusieurs études *in vitro* ont montré la capacité de la GH à stimuler la prolifération des ostéoblastes et l'expression de marqueurs de différenciation ostéoblastique (OC, ALP et α 1-procollagène) (Rosen *et al*, 1995 ; Chihara et Sugimoto, 1997 ; Morales *et al*, 2004 ; Giustina *et al*, 2008). Des travaux antérieurs réalisés au sein du laboratoire ont mis en évidence que la GH stimule la formation de cellules multinuclées TRAP+ (Guicheux *et al*, 1998a) et stimule l'activité de résorption des ostéoclastes via l'IGF1 (Guicheux *et al*, 1998b). Le rôle de la GH sur le tissu osseux est largement documenté et malgré les similitudes entre le tissu osseux et les tissus dentaires, peu d'auteurs se sont intéressés aux effets de la GH au cours de la croissance craniofaciale et du développement dentaire.

Chez l'homme, dans les cas d'insuffisance ou d'excès de sécrétion de GH, des manifestations buccodentaires ont été décrites.

Les enfants atteints de nanisme hypophysaire (dû à un déficit en hormone de croissance) présentent une incidence plus élevée d'agénésies dentaires. Les dents sont de plus petite taille et des retards d'éruption résultants d'un retard de développement dentaire sont observés (Kosowicz et Rzymiski, 1977 ; Bigeard et Sommermater, 1991). Un traitement par la GH chez ces patients restaure l'âge osseux mais a peu d'incidence sur l'éruption dentaire. Chez les patients atteints du syndrome de Laron (nanisme où le taux de plasmatique de GH est normal voire élevé mais où il n'y a pas de sécrétion d'IGF1 car le récepteur à la GH est absent dans le foie), des agénésies, des dents de plus petites tailles et des retards d'éruption sont également décrits (Sarnat *et al*, 1988). Les patients atteints d'acromégalie (gigantisme dû à un excès de sécrétion de la GH) présentent un prognathisme, des malocclusions dentaires avec la présence

de nombreux diastèmes (Chanson et Salenave, 2008) et une cémentogenèse accentuée (Young, 1995).

A l'heure actuelle chez l'homme, aucune anomalie de structure dentinaire majeure n'a été observée dans les cas de déficience ou d'excès en GH.

In vivo, la présence du récepteur à la GH (GHR) a été décrite sur les améloblastes, les odontoblastes et les cémentoblastes aux différents stades de développement dentaire chez le rat (Zhang *et al*, 1992a et b ; Joseph *et al*, 1994 ; Young, 1995), suggérant un rôle de la GH dans le développement dentaire.

Chez le rat, parallèlement aux hypodonties et aux retards d'éruption dentaire (similaire à ce qui a été observé chez les enfants atteints de nanisme hypophysaire), des études anciennes montrent une diminution de la production de dentine (Hansson, 1978a). Un traitement à la GH chez ces animaux permet de restaurer la production dentinaire (Hansson, 1978b). Dans les molaires de rat, des marquages immunohistochimiques ont montré la présence du récepteur à la GH sur les odontoblastes situés sur plancher pulpaire et dans la partie apicale des racines en formation ; le récepteur n'étant pas retrouvé dans les odontoblastes matures de la pulpe coronaire (Zhang *et al*, 1992a). De même, chez le rat, il a été mis en évidence la présence de membres de la famille des JAK et des STAT dans les odontoblastes ; les auteurs suggérant l'activation des voies de signalisation de la GH lors de la dentinogenèse (Tanase et Bawden, 1996a et b). Des immunomarquages réalisés sur des molaires de rats Lewis dwarf (modèle de déficience en GH) montrent que 5 jours de traitement GH induisent une augmentation du nombre d'odontoblastes qui sécrètent de l'ALP, de la BMP2 et 4, de l'ostéoclastine et de l'ostéopontine (Young *et al*, 2001). Dans le même modèle, la GH augmente l'expression de décorine et de biglycan (Zhang *et al*, 1995) et du N-acetylgalactosamine protéoglycane (Zhang *et al*, 1994), trois protéoglycanes impliqués dans la dentinogenèse suggérant un rôle de la GH dans la formation de dentine chez le rat.

Récemment l'étude du phénotype dentaire chez trois types de souris génétiquement modifiées a montré que la GH influence l'épaisseur ainsi que le volume total de la dentine. Dans cette étude, les auteurs ont mesuré les dimensions de la matrice dentinaire sur des sections longitudinales de molaires de ces trois types souris. Les souris dites « géantes » qui présentent une taille plus importante du fait d'une sécrétion excessive de GH (modèle de gigantisme pituitaire) ont une apposition de dentine coronaire plus importante que les souris sauvages. Sur les deux types de souris dites « naines » qui sont de plus petite taille (une lignée surexprime un antagoniste de la GH et constitue un modèle de nanisme hypophysaire ; l'autre

lignée est invalidée pour le récepteur à la GH et constitue le modèle du syndrome de Laron) il a été observé et une épaisseur de dentine radiculaire plus faible que sur les souris sauvages (Smid *et al*, 2007).

Les résultats de ces études permettent de conclure à l'influence de la GH sur la dentinogenèse *in vivo*, chez le rat et la souris. Mais, contrairement à d'autres molécules (comme la vitamine D) influençant les tissus dentinaires et osseux, peu d'études ont été réalisées *in vitro* pour analyser les effets de la GH sur les odontoblastes, cellules responsables de la dentinogenèse.

Dans ce travail, afin de mieux comprendre les mécanismes d'action de la GH sur les odontoblastes, nous avons étudié *in vitro*, l'effet de la GH sur la prolifération et la différenciation des odontoblastes de rat M2H4.

La lignée M2H4 nous a été gentiment fournie par H. Ritchie. Ce sont des cellules dérivées de la lignée RPC-C2A.

La lignée RPC-C2A a été établie à partir de pulpe dentaire d'incisive de rat. Le clone RPC-C2A a été sélectionné par sa forte activité phosphatase alcaline (Kasugai *et al*, 1988).

Le sous clone M2H4 (Ritchie *et al*, 2002) a été sélectionné pour sa très forte coloration Von Kossa après traitement des cellules par 50 µg/ml d'acide ascorbique pendant 8 jours et par 4mM de Pi pendant 3 jours. Ces cellules sont capables de synthétiser une matrice collagénique contenant notamment du collagène de type I et expriment le transcrite de DSPP (Ritchie *et al*, 2002).

Dans son étude, Ritchie *et coll* donnent peu d'informations sur leur lignée (Ritchie *et al*, 2002). D'autre part, il est connu que les lignées peuvent se dédifférencier. Il nous a donc semblé indispensable de refaire la caractérisation de cette lignée avant leur utilisation dans le cadre de l'évaluation des effets de la GH. Dans ce but, nous avons participé aux travaux de D. Magne, Doctorant au laboratoire.

Dans un premier temps, nous nous sommes intéressés à l'expression de différents marqueurs de différenciation des odontoblastes sur la lignée M2H4.

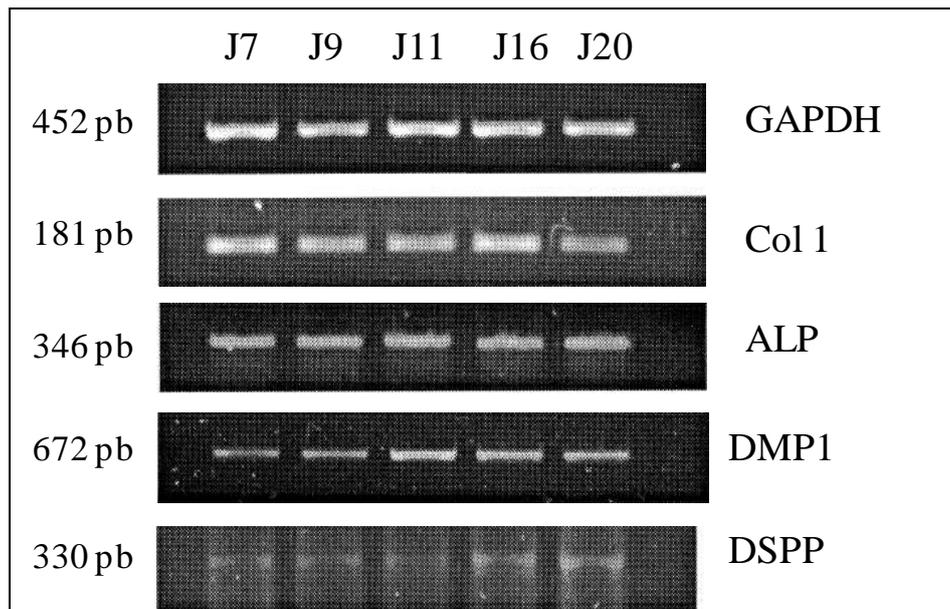


Figure 3.4 : Etude de l'expression des transcrits du collagène de type 1 (Col 1), de la phosphatase alcaline (ALP), de la dentin matrix protéine (DMP1) et de la dentine sialophosphoprotéine (DSPP) dans des cultures de cellules M2H4 de J7 à J21. La GAPDH est utilisée comme gène de référence. Un gel d'agarose représentatif est montré. (Magne et al, 2004).

Nos résultats de RT-PCR montrent que les cellules M2H4 expriment l'ARNm de *coll1 α 1* (qui constitue près de 90% de la fraction protéique dentinaire) et de l'ALP (qui est impliquée dans la minéralisation de la dentine) dès J7 et que cette expression reste présente jusqu'à J20.

En ce qui concerne l'expression de marqueurs odontoblastiques majeurs, DSPP et DMP1, nos résultats montrent l'expression de ces deux marqueurs dans les cellules M2H4. Malgré le fait que l'expression des transcrits n'ai été étudié qu'en PCR semi quantitative, il semble que l'expression de DMP1 augmente jusqu'à J11 puis reste constante alors que l'expression des transcrits de DSPP apparaît plus tardivement.

L'ensemble de ces résultats montre que la différenciation des M2H4 se rapproche fortement de la différenciation odontoblastique *in vivo* ce qui est en accord avec la caractérisation initiale de cette lignée par H. Ritchie.

La phase minérale formée a également été caractérisée par Spectroscopie Infra Rouge à Transformé de Fourier.

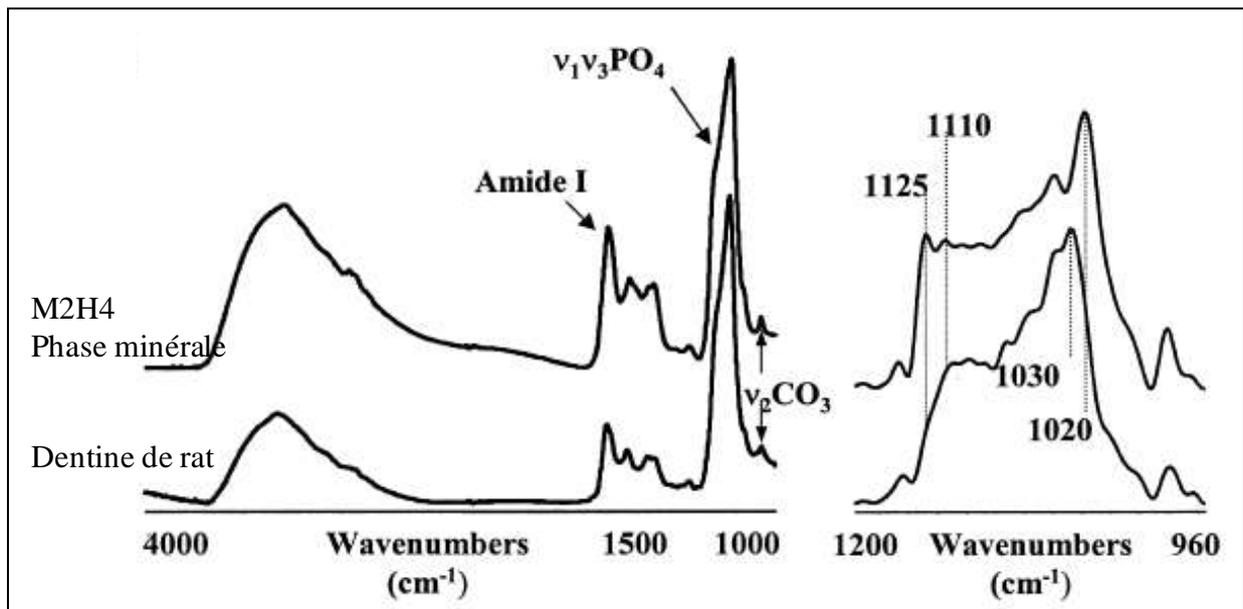


Figure 3.5 : Analyse de la phase minérale formée par Spectroscopie Infra rouge à Transformée de Fourier (Magne et al, 2004).

La phase minérale formée par les M2H4 après 21 jours de culture a été analysée par spectroscopie infra rouge à transformé de Fourier et a été comparée à de la dentine de rat. Nos résultats montrent que la phase minérale formée est constituée d'apatite carbonatée semblable à celle des sections de dentine de rat. Cependant les cristaux sont moins minéralisés ce qui suggère que la matrice n'est pas complètement minéralisée à J21.

L'ensemble de ces résultats a été publié par D. Magne en 2004 (Development of an Odontoblast In Vitro Model to Study Dentin Mineralization, Connect Tissue Res, 2004, 45, 101-108).

La lignée M2H4 présente donc un phénotype odontoblastique, lui conférant un intérêt dans l'étude *in vitro* de la dentinogenèse.

3.3 Matériels et méthodes

3.3.1. Matériels

Les plaques et flacons de cultures ont été fournis par Corning-Costar (Corning BV Life Sciences, Schiphol-Rijk, Pays-Bas). Le sérum de veau foetal (SVF) provient de chez D.

Dutscher (Brumath, France). Les milieux de culture: alpha Minimal Essential Medium (α -MEM), la L-glutamine, les antibiotiques (Pénicilline/Streptomycine), la Trypsine/EDTA, le Trizol, la DNase (désoxyribonucléase), les dNTPs (désoxynucléotides tri phosphate), la TaqDNA polymérase, les gels NuPage 4-12% Bis-Tris, les membranes Invitrolon™ PVDF (polyvinylidene difluoride), le PBS (Phosphate Buffered Saline) et le tampon TRIS Borate EDTA (TBE) ont été acquis chez Invitrogen Corporation (Paisley, UK).

La GH humaine (UMATROPE 1,3mg/2ml) nous a été fournie par les laboratoires Lilly France. Le lyophilisat est dilué dans l'excipient puis dans du PBS/BSA 0,5%.

L'UO126, l'EDTA (éthylènediaminetetraacetic acid disodium selenite), l'EGTA (éthylène glycol-bis(beta-aminoéthyl ether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid tetrasodium salt), l'orthovanadate de sodium (Na_3VO_4), le PMSF (phenylmethanesulfonyl fluoride), le fluorure de sodium (NaF), le beta-mercaptoéthanol, le sodium dodécyl sulfate (SDS), l'albumine de sérum bovin (BSA), le Tween 20, l'acide phosphonoformique (PFA) et le bleu de bromophénol proviennent de chez Sigma-Aldrich Corporation (St Quentin Fallavier, France). L'AMV-RT (avian myeloblastosis virus-reverse transcriptase), les amorces hexanucléotidiques aléatoires et la RNAsin (Recombinant ribonuclease inhibitor) ont été achetés chez Promega (Charbonnière, France).

Le Master Mix a été fourni par Stratagene, le SyBr Green par Molecular Probes Inc. (Amsterdam, Netherlands) et la Titanium Taq DNA polymérase par Clontech (Mountain View, CA, USA).

Le réactif Pierce Coomassie Plus Assay provient de chez Pierce (Rockford, IL, USA), les anticorps utilisés pour le western blot de chez Cell Signaling Inc. (Beverly, MA, USA) et l'ECL (Enhanced Chemiluminescence) et le système de détection pour le western blot proviennent de chez Amersham Biosciences (Buckinghamshire, UK).

3.3.2. Cultures cellulaires

Les cellules M2H4 nous ont été fournies par H. Ritchie. Les cellules sontensemencées à une densité cellulaire de 12000 cellules par cm^2 et cultivées dans du milieu α -MEM supplémenté en pénicilline/streptomycine (100 UI/ml-100 μg /ml), en L-glutamine (2mM) et en sérum de veau fœtal (SVF) (10%). Les cellules sont cultivées dans ces conditions jusqu'au deuxième

passage en renouvelant le milieu de culture tous les deux jours puis utilisées pour les expérimentations.

La lignée MC3T3-E1 a été cultivée dans du milieu α -MEM supplémenté en pénicilline/streptomycine (100 UI/ml-100 μ g/ml), en L-glutamine (2mM) et en SVF (10%). Toutes les cellules sont incubées en atmosphère humide, à 37°C et 5% de CO₂. Le milieu de culture est renouvelé tous les deux jours.

3.3.3. Prolifération cellulaire

Pour l'étude de l'effet de la GH sur les M2H4, les cellules sontensemencées à une densité cellulaire de 6 000 cellules/cm² dans du milieu α -MEM contenant 1% Pénicilline/Streptomycine, 1% L-Glutamine.

Après 3, 5 et 7 jours de culture en présence de différentes concentrations de GH (5 à 500 ng/ml) et différentes concentrations de SVF (1 à 10%), les cellules M2H4 sont décollées avec de la trypsine/EDTA, centrifugées et remises en suspension dans du milieu de culture. Les cellules sont ensuite comptées à l'aide d'une cellule de Malassez suivant la méthode d'exclusion par le bleu trypan. Les résultats sont exprimés en nombre de cellules par puit.

Afin d'étudier l'implication de la voie ERK1/2 dans la stimulation de la prolifération par la GH, nous avons réalisé des comptages cellulaires en présence de U0126 (inhibiteur de la voie ERK1/2). Après 3 jours de culture avec 500 ng/ml de GH, 2% de SVF et 1 μ M de U0126 ou son excipient (DMSO), les cellules M2H4 sont comptées comme précédemment décrit. Les résultats sont exprimés en nombre de cellules par puit.

3.3.4. Western Blot

Les cellules M2H4 sontensemencées dans des plaques 6 puits à une densité cellulaire de 6000 cellules/cm² et cultivées pendant 3 jours dans du milieu standard en présence de 2% de SVF. Les cellules sont ensuite déprivées en sérum pendant 24 heures, puis stimulées pendant 30 minutes par 500ng/ml de GH. Le milieu de culture est alors éliminé et les plaques sont congelées dans de l'azote liquide puis conservées à -80°C. Après décongélation sur de la

glace, les cellules sont lysées par du tampon de lyse (Tris-HCl pH7,5 20mM, KCl 100mM, EDTA 1mM, EGTA 1mM, DTT 1mM, β -Glycérophosphate 20mM, Na_3VO_4 2mM, PMSF 1mM, NaF 10mM). Le lysat est centrifugé à 13 200 g pendant 10 min à 4°C. La concentration en protéines des surnageants est mesurée par la méthode de Bradford en utilisant le réactif Pierce Coomassie Plus. La lecture de la densité optique à 595nm est réalisée dans un lecteur multiplaque MRX (VWR International, Brumath, France). Les lysats protéiques sont finalement conservés à -20°C jusqu'à leur utilisation ultérieure.

Les westerns blot ont été réalisés avec le système XCell SureLock™ Novex Mini-Cell (Invitrogen). La séparation par SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulfate-PolyAcrylamide Gel Electrophoresis) se fait en ajoutant du LDS (Lithium dodécyl sulfate) et un agent réducteur (du beta-mercaptoéthanol) à 40 μ g de protéines pour chaque échantillon. Après réduction par chauffage pendant 10 minutes à 70°C, les échantillons sont chargés sur un gel à 4-12% d'acrylamide. La migration des protéines s'effectue selon les instructions du fournisseur pendant 1 heure sous une tension de 200 Volt.

Le transfert des protéines est réalisé sur une membrane de PVDF. Le transfert est réalisé selon les instructions du fournisseur pendant 2 heures sous une tension de 30 Volt.

La membrane est ensuite bloquée une heure dans une solution de PBS1X contenant 0,05% de Tween20 et 5% de lait en poudre. La membrane est ensuite incubée pendant 12 heures, à 4°C, en présence de l'anticorps primaire. Les anticorps primaires sont dilués au millième dans la solution de blocage pour la détection de la forme phosphorylée (anti-phospho ERK1/2) ou de la forme totale (anti-ERK1/2) de ERK1/2 et dans une solution de PBS1X contenant 0,05% de Tween 20 et 5% de BSA pour la détection de la forme phosphorylée (anti-phospho STAT5) ou de la forme totale (anti-STAT5) de STAT5. Après 3 lavages de 5 minutes dans une solution de PBS1X contenant 0,05% de Tween20, la membrane est finalement incubée en présence de l'anticorps secondaire (1/2000 dans une solution de PBS1X contenant 0,05% de Tween20 et 5% de lait en poudre) (anti-IgG de lapin couplé à la HorseRadish Peroxydase (HRP)). Les complexes protéiques sont détectés par chémiluminescence grâce au kit ECL Plus.

3.3.5. Extraction d'ARN

Pour les cellules M2H4, après 4, 10 et 14 jours de culture en présence de GH, le milieu est éliminé et 1ml de Trizol est ajouté par flacon de culture. Les échantillons sont alors conservés à -80°C.

Les cellules pulpaire humaines sont cultivées pendant 21 jours puis déprivées en sérum pendant 24 heures. La GH est ensuite ajoutée pendant 24 heures et les cellules sont alors congelées dans du Trizol comme précédemment décrit.

Après décongélation des échantillons sur de la glace, les lysats sont récupérés par grattage, et centrifugés à 13 200 g pendant 10 minutes à 4°C. 200µl de chloroforme sont ajoutés au surnageant puis centrifugés à 13 200 g pendant 15 minutes à 4°C. Les ARN totaux contenus dans la phase aqueuse sont alors précipités par ajout de 500 µl d'isopropanol, puis centrifugés à 13 200 g pendant 15 minutes à 4°C. Le culot est lavé à l'éthanol 75%, séché, puis repris dans 50µl d'eau distillée. La concentration est mesurée par lecture de la densité optique (DO) à 260 nm et la pureté des ARN est évaluée par le rapport des DO à 260 et 280 nm. La concentration des ARN est alors ajustée à 1µg/µl. L'intégrité des ARN est vérifiée par migration sur gel d'agarose à 1%.

3.3.6. RT-PCR

2,5µg d'ARN sont traités par 0,1UI/µl de DNase dans son tampon de réaction (Invitrogen) dans un volume final de 10µl pendant 15 minutes à température ambiante puis 10 minutes à 65°C après ajout d'1µl d'EDTA (Invitrogen).

Les ARN subissent une reverse transcription à 42°C pendant 50 minutes par 0,33 UI/µl d'AMV-RT et en présence de 1mM de dNTPs, 50nM d'amorces hexanucléotidiques aléatoires, 6µl de tampon de reverse transcription (5X) (Invitrogen) et 1,33UI/µl de RNasin dans un volume final de 30µl.

Puis 2,5µl d'ADNc sont amplifiés par 0,1 UI/µl de *Taq*DNA polymérase avec 0,2mM de chacune des amorces spécifiques de l'ADNc à détecter (cf. Tableau 3.1), 0,2µM dNTPs, 1µM MgCl₂ et 2,5µl de tampon de réaction (10X) (Invitrogen) dans un volume final de 25µl.

L'amplification est réalisée dans un thermocycleur « Eppendorf Mastercycler personal » (Heidelberg, Allemagne). Après une première phase de dénaturation des ADNc à 95°C pendant 3 minutes, l'ADNc est amplifié par cycles comprenant trois phases de 20 secondes :

une dénaturation à 95°C, une hybridation avec les amorces à 60°C et une élongation à 72°C. Le nombre de cycle est référencé dans le tableau 3.1.

La migration des produits de PCR se fait dans un gel d'agarose à 2%. La révélation des bandes d'ADN se fait par du Bromure d'éthidium à l'aide d'un trans illuminateur UV. Le dessin des amorces est fait par le logiciel Beacon Designer 5.0.

3.3.7. PCR quantitative en temps réel

L'amplification se fait en mélangeant 5µl d'ADNc dilués au 1/30 avec le mélange réactionnel. Ce mélange est composé de 12,5µl de Master Mix, de chacune des amorces spécifiques du gène à détecter aux concentrations spécifiées dans le tableau 3.2, 30nM de la sonde SyBr Green dans un volume final de 20 µl. La réaction et la mesure de la fluorescence en temps réel se font avec un appareil MX3000pro. Les ADNc sont amplifiés par 40 cycles, comprenant trois phases: une dénaturation de 30 secondes à 95°C, une hybridation avec les amorces de 1 minute à 60°C et une élongation de 30 secondes à 72°C, précédées par une phase de dénaturation de 10 minutes à 95°C. Le traitement informatique des données se fait avec le logiciel Mx PRO en utilisant la méthode du delta Ct (Cycle threshold). Cette méthode a été utilisée pour calculer les niveaux d'expression relative, comme décrit précédemment (Julien *et al*, 2007). Les résultats sont exprimés en expression relative de DMP1 par rapport à l'β-actine utilisé comme gène de référence.

3.3.8. Analyse statistique

Chaque expérience a été réalisée en triplicate et répétée au moins deux fois avec des résultats similaires. Des études comparatives à partir des moyennes, ont été réalisées en utilisant un test ANOVA avec des valeurs significatives pour $p < 0,05$. Les résultats sont exprimés en moyenne des valeurs +/- SEM.

3.4. Résultats

3.4.1. Expression du récepteur de la GH

Afin de déterminer si les M2H4 sont des cellules cibles à la GH nous avons recherché la présence du GHR et étudié sa fonctionnalité.

Nous avons tout d'abord étudié l'expression de l'ARNm du récepteur à la GH par RT-PCR.

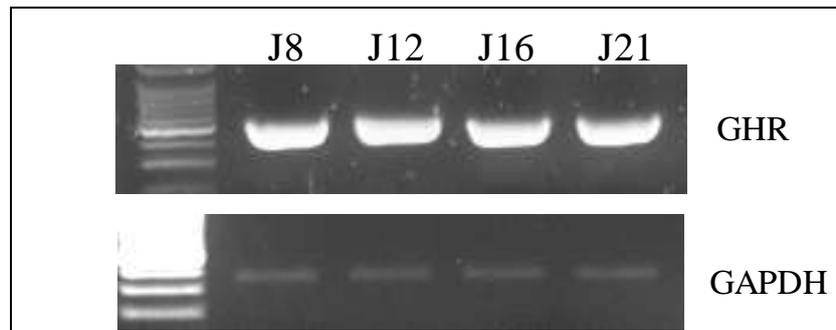


Figure 3.6 : Mise en évidence du GHR dans la lignée M2H4. Détection de l'expression de l'ARNm codant pour le GHR par RT-PCR dans les cellules M2H4. Un gel d'agarose représentatif est montré.

Nos résultats montrent que les cellules M2H4 expriment l'ARNm codant pour le GHR de J8 à J21 (Fig. 3.6).

Après avoir mis en évidence la présence du récepteur de la GH sur les M2H4, nous avons vérifié que le récepteur de la GH chez le rat pouvait interagir avec l'hormone de croissance humaine comme décrit précédemment (Barnard *et al*, 1991; Leung *et al*, 1996) et déclencher la cascade de réactions cellulaires décrites dans la figure 3.2. Nous avons donc étudié par Western blot sur les cellules M2H4, l'activation de la voie de signalisation STAT5.

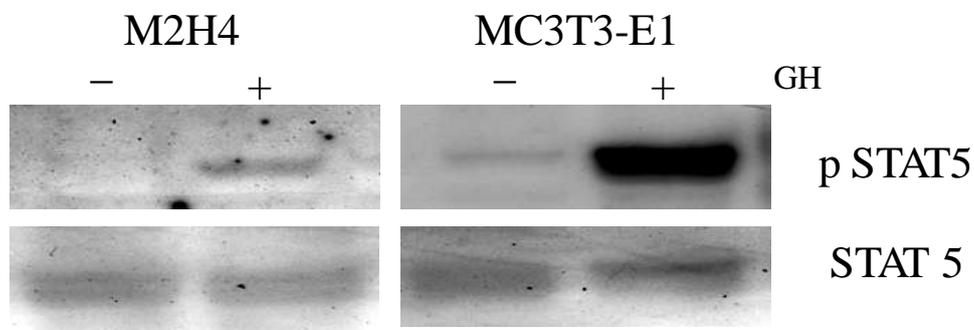


Figure 3.7 : Mise en évidence du GHR dans la lignée M2H4: Mise en évidence par Western Blot de la phosphorylation de STAT 5 après un traitement GH. Les cellules MC3T3 sont utilisées comme contrôle positif.

Nos résultats montrent qu'après 3 jours de culture, un traitement par 500ng /ml de GH pendant 30 minutes, stimule la phosphorylation de STAT5 (Fig.3.7). Cette stimulation est inférieure à celle retrouvée dans les cellules ostéoblastiques de souris MC3T3-E1 utilisées comme contrôle positif (Morel *et al*, 1993). La forme non phosphorylée de STAT5 n'est pas influencée par un traitement à la GH ni dans les M2H4 ni dans les MC3T3-E1 (Fig.3.7).

Sur les cellules osseuses, la fixation de la GH sur son récepteur induit la synthèse et la sécrétion d'IGF1 (Giustina *et al*, 2008). Nous nous sommes donc intéressés aux effets de la GH sur l'expression du gène de l'IGF1 dans les M2H4.

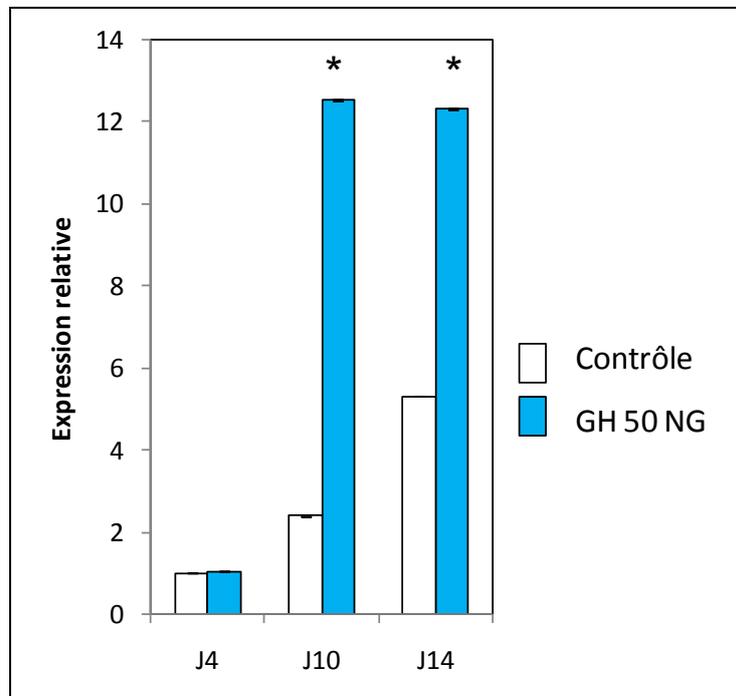


Figure. 3.8 : Etude par PCR quantitative de l'effet de la GH sur l'expression d'IGF1. Les résultats d'une expérimentation représentative sont montrés.

Nos résultats en RT-PCR en temps réel montrent que le niveau basal du transcrite d'IGF1 augmente en fonction du temps de culture de J4 à J14 et que la GH (50 ng/ml) stimule l'expression du transcrite de l'IGF1 de manière significative à J10 (x6) et à J14 (x 2,5) dans notre modèle cellulaire (fig.3.8).

L'ensemble de ces résultats suggèrent que les M2H4 expriment le récepteur à la GH et que celui-ci est fonctionnel. Les M2H4 sont donc des cellules cibles pour la GH et constituent un modèle de cellules odontoblastiques intéressant pour étudier les effets de l'hormone de croissance sur les cellules responsables de la dentinogenèse.

3.4.2. Effet de la GH sur la prolifération cellulaire

In vitro, la GH stimule la prolifération cellulaire de cellules ostéoblastiques (Kassem *et al*, 1994 ; Morales *et al*, 2004, Giustina *et al*, 2008). Afin de déterminer l'effet de la GH sur la prolifération cellulaire des cellules M2H4, nous avons effectué des comptages cellulaires en présence de 500ng de GH ou de son contrôle (PBS à 0,5% BSA).

Dans un premier temps, nous avons étudié la prolifération cellulaire des M2H4 après 3 jours de culture dans des conditions de culture supplémentées en différentes concentrations de sérum et en présence de 500ng de GH.

L'étude de l'effet de la GH sur la prolifération cellulaire ne peut se faire qu'en condition de culture contenant peu de sérum de veau fœtal. En effet, le sérum contient des facteurs de croissance et de la GH (en quantité variable d'un lot à l'autre) ce qui peut perturber ou masquer les effets de la GH. Nous avons donc dans un premier temps étudié la prolifération cellulaire sous 500mg de GH en présence de doses croissantes de SVF.

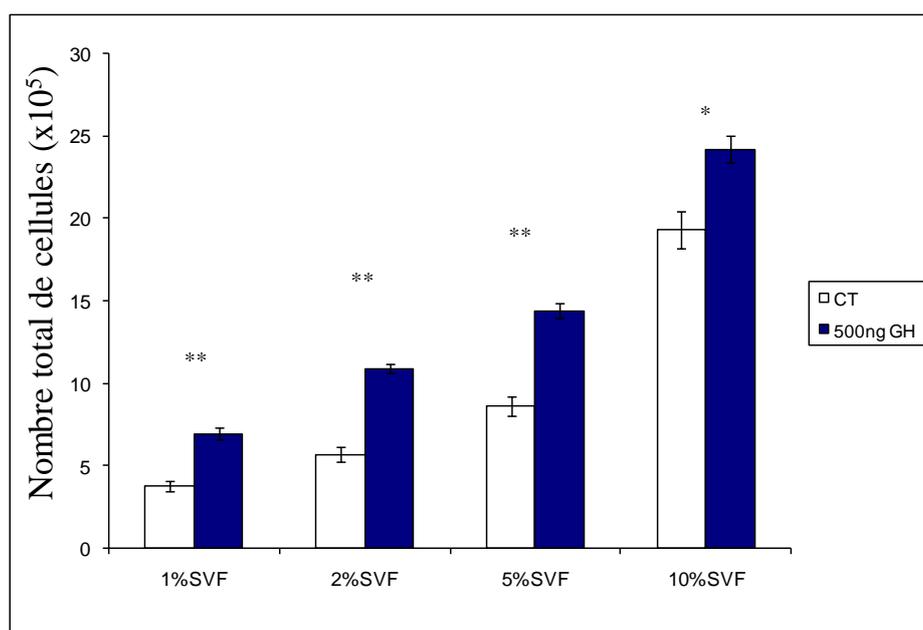


Figure 3.9 : Effet de la quantité de sérum sur la prolifération cellulaire sous traitement GH. Les cellules M2H4 sont cultivées en triplicate en présence de 500ng/ml de GH et de différentes concentrations de SVF. Les comptages sont effectués à J3. Les résultats sont exprimés en nombre total de cellules par puit +/- SEM. * $p < 0.05$ et ** $p < 0.01$.

Nos résultats montrent tout d'abord qu'à J3, la prolifération cellulaire dans les conditions contrôles est dose sérum dépendante. De plus, la GH stimule la prolifération cellulaire des M2H4, à J3, de manière significative quelque soit le pourcentage de sérum. Enfin, l'effet de la GH sur la prolifération cellulaire est le plus important avec 2% de sérum car à cette concentration, nous observons un doublement du nombre de cellules après trois jours de culture en présence de 500ng de GH (Fig. 3.9).

Nous choisissons donc de cultiver les M2H4 en présence de 2% de sérum.

Dans un deuxième temps, nous avons étudié les effets de doses croissantes de GH sur le nombre de cellules après 3 jours de culture.

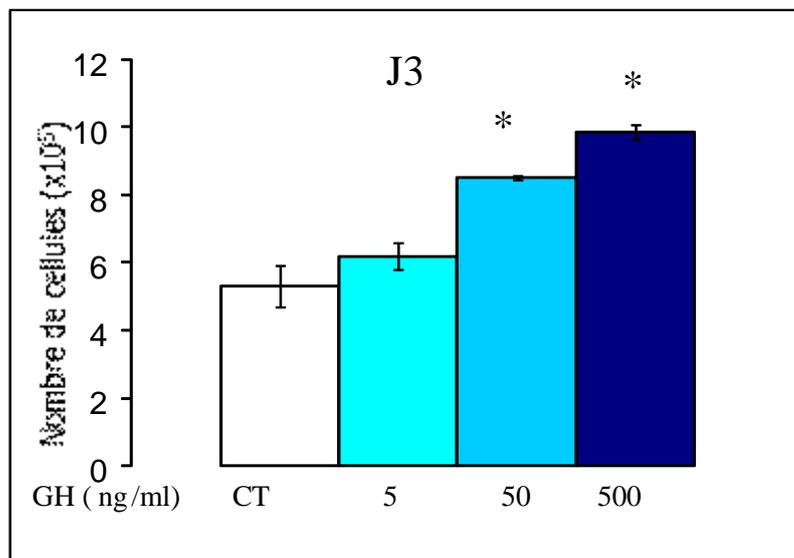


Figure 3.10 : Effet de la dose de GH sur la prolifération cellulaire. Les cellules M2H4 sont cultivées en triplicate en présence de différentes concentrations de GH et les comptages sont effectués à J3 comme précisé dans le matériel et méthodes. Les résultats d'une expérimentation représentative sont montrés. Les résultats sont exprimés en nombre total de cellules par puit +/- SEM. * $p < 0.05$

Nos résultats montrent que des concentrations de 50 ng/ml et 500 ng/ml de GH entraînent une augmentation significative du nombre de cellules par rapport aux conditions contrôles (respectivement x 1,6 et x 1,85). La concentration de 5 ng/ml de GH n'a pas d'effet significatif sur la prolifération des M2H4 (Fig. 3.10).

Les effets de l'hormone de croissance ont également été testés à différents jours de culture.

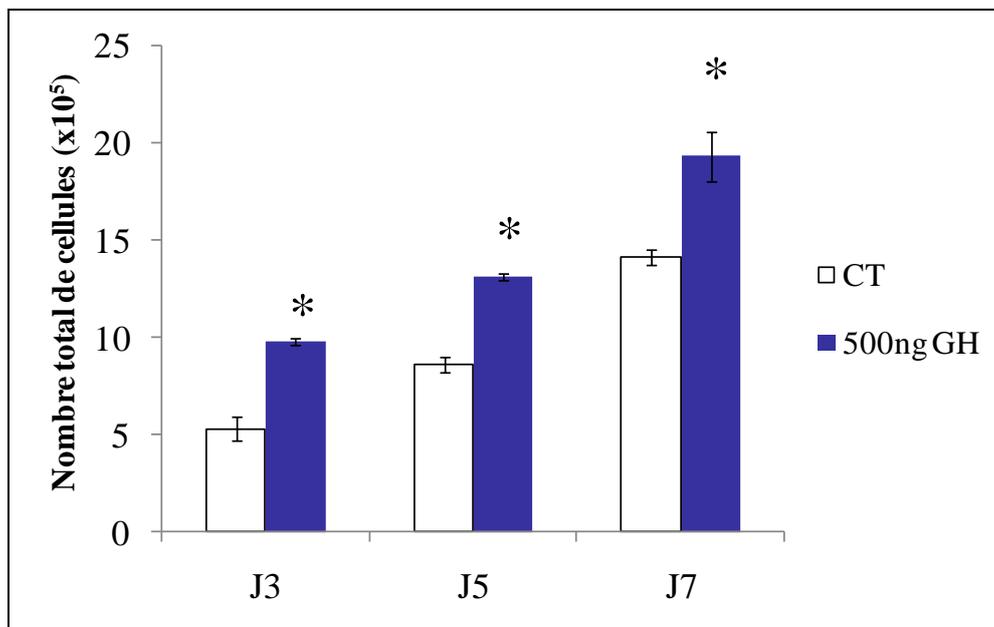


Figure 3.11 : Effet d'un traitement par 500ng de GH sur la prolifération cellulaire des M2H4 à différents jours de culture. Les résultats d'une expérimentation représentative sont montrés. Les résultats sont exprimés en nombre total de cellules par puit +/- SEM. * $p < 0.05$.

Une concentration de 500 ng/ml de GH a un effet stimulant sur la prolifération, à J3, J5 et J7, avec une augmentation significative de la prolifération de x1,85 à J3, x1,5 à J5 et x1,4 à J7 (Fig. 3.11). De plus nous pouvons observer que le nombre de cellules augmente régulièrement entre J3 et J7 dans les conditions contrôle (2% de sérum).

L'ensemble de ces résultats montrent que la GH stimule la prolifération cellulaire des cellules M2H4 de façon dose dépendante.

3.4.3. Etude de l'implication de la voie ERK1,2

Nous avons montré dans la figure 3.6 que la GH active la voie STAT5. Etant donné que la GH est décrite pour activer également la voie ERK (figure 3.2), nous avons étudié l'implication de cette voie de signalisation dans l'effet de la GH sur les cellules M2H4.

Nous avons d'abord regardé si la voie de signalisation ERK1,2 était activée par un traitement GH.

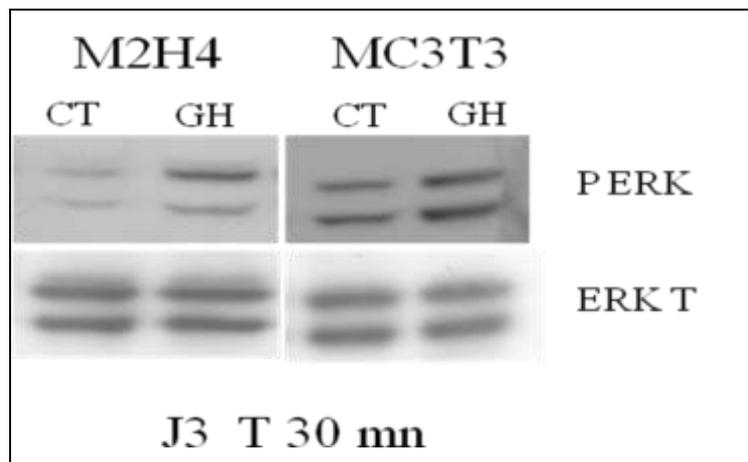


Figure 3.12 : Effet de la GH sur la phosphorylation d'ERK1/2. Les échantillons sont analysés par Western blot en utilisant des anticorps spécifiques dirigés contre P- ERK1/2 et ERK1/2. Les cellules MC3T3 sont utilisées comme contrôle positif (n=1).

Afin de démontrer que la voie ERK est activée dans les M2H4 par un traitement à la GH, nous avons étudié la phosphorylation de ERK1/2 par Western Blot. Nos résultats montrent, à J3, après 30 minutes de traitement avec 500ng/ml de GH, une stimulation de la forme phosphorylée de ERK1/2 alors que le niveau basal de ERK1/2 reste stable. Cette stimulation de la forme phosphorylée de ERK1/2 est également retrouvée dans les cellules MC3T3-E1 utilisées comme contrôle positif (Fig. 3.12).

La voie de signalisation ERK est classiquement décrite comme impliquée dans la prolifération des cellules osseuses (Lai *et al*, 2001). Afin d'étudier l'implication de la voie ERK dans la stimulation de la prolifération des M2H4 par la GH, nous avons réalisé des comptages cellulaires en présence de U0126 (inhibiteur spécifique de la voie ERK).

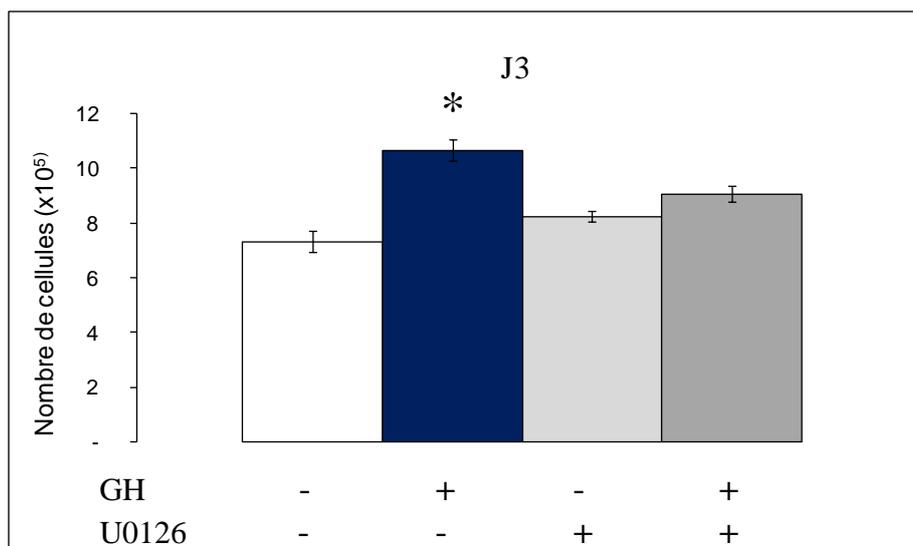


Figure 3.13 : Etude de la prolifération cellulaire à J3 en présence de l'inhibiteur de la voie ERK1/2, l'U0126. Les résultats d'une expérimentation représentative sont exprimés en nombre total de cellules par puit +/- SEM.

Nous observons que la stimulation de la prolifération par GH dans la condition 500ng/ml de GH et 2 % de SVF est annulée en présence d'U0126 (Fig. 3.13). Ceci suggère que la voie ERK est impliquée dans la stimulation de la prolifération cellulaire des M2H4 par la GH.

L'ensemble de ces résultats démontre que les effets de la GH sur la prolifération cellulaire semblent médiés par la voie ERK.

3.4.4. Effet de la GH sur l'expression de marqueurs de différenciation odontoblastique

In vitro, la GH a été largement impliquée dans la différenciation cellulaire des cellules osseuses (pour revue voir Giustina *et al*, 2008). Pour tester l'effet de la GH sur la différenciation des odontoblastes, nous avons étudié sur les M2H4 par RT-PCR en temps réel, l'expression de différents marqueurs après un traitement de 4, 10 et 14 jours avec de la GH à 50 ng ou avec son contrôle (PBS à 0,5% BSA) et en 2% de sérum.

Nous avons tout d'abord étudié l'expression d'un gène impliqué de façon précoce dans la différenciation des tissus osseux et dentinaire : Runx2. Runx2 est un facteur de transcription

indispensable à la différenciation du tissu dentinaire (Camilleri and McDonald, 2006; D'Souza *et al*, 1999).

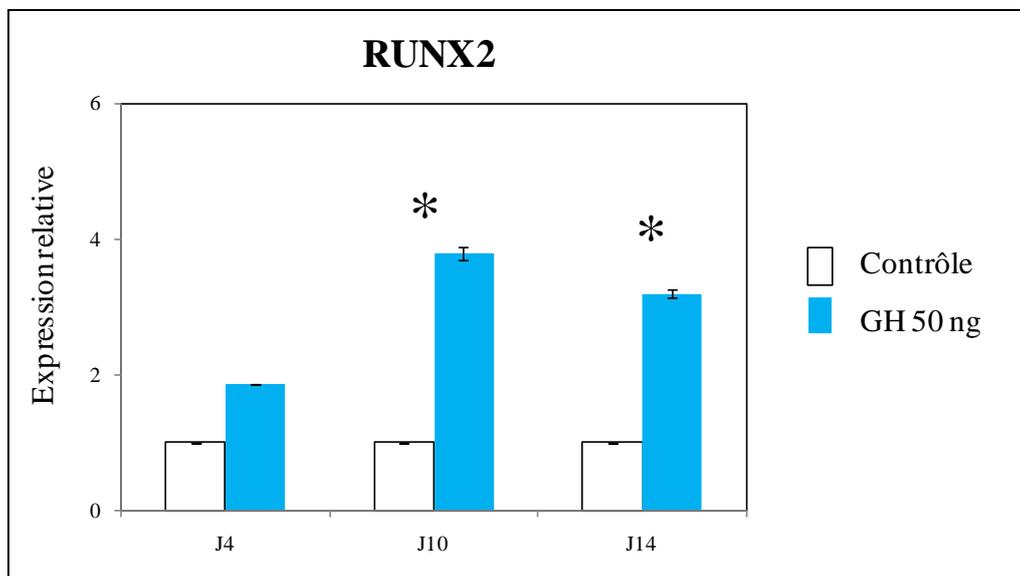


Figure. 3.14 : Etude par PCR quantitative de l'effet de la GH sur l'expression de Runx2. Les résultats d'une expérimentation représentative sont montrés.

Nos résultats de RT-PCR en temps réel indiquent une stimulation du niveau d'expression de Runx2 de J4 à J14 en présence de 50 ng de GH alors que le niveau d'expression ne varie pas dans les conditions contrôle (Fig. 3.14).

Nous avons ensuite analysé l'expression de DMP1, un des marqueurs principaux des odontoblastes.

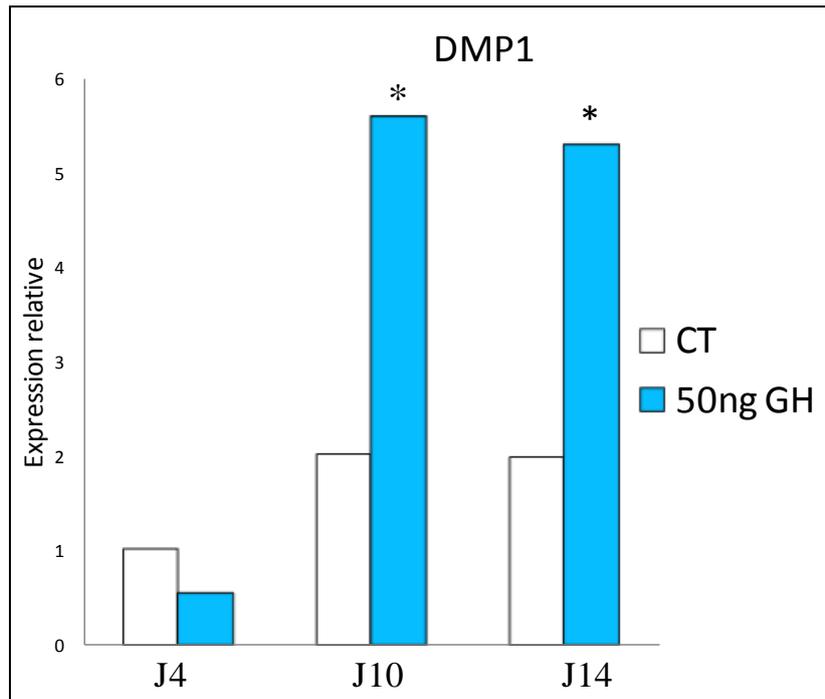


Figure 3.15 : Etude par PCR quantitative de l'effet de la GH sur l'expression de DMP-1. Les résultats d'une expérimentation représentative sont montrés.

Nos résultats de RT-PCR en temps réel confirment les résultats obtenus en PCR semi quantitative où les M2H4 étaient cultivées en présence de 10% de sérum et de Pi (Fig. 3.4) et montrent que les cellules M2H4 cultivée en 2% de sérum expriment le transcrite de DMP-1 avec une augmentation du niveau d'expression de J4 à J10 et une stabilisation après J10 (Fig.3.15).

D'autre part, la GH stimule fortement l'expression des transcrits de DMP1 à J10 et J14 avec une expression relative respectivement 3 et 4 fois plus importante (Fig.3.15).

Nous avons également étudié l'expression de deux facteurs de transcription BMP2 et BMP4. En effet, les BMPs sont impliquées dans le développement dentaire (Nie *et al*, 2006). D'autre part, une étude de Li en 1998 montre que la GH augmente l'expression des transcrits de BMP2 et BMP4 (par RT-PCR) dans des cultures fibroblastiques pulpaire issues de dents de sagesse humaine (Li *et al*, 1998).

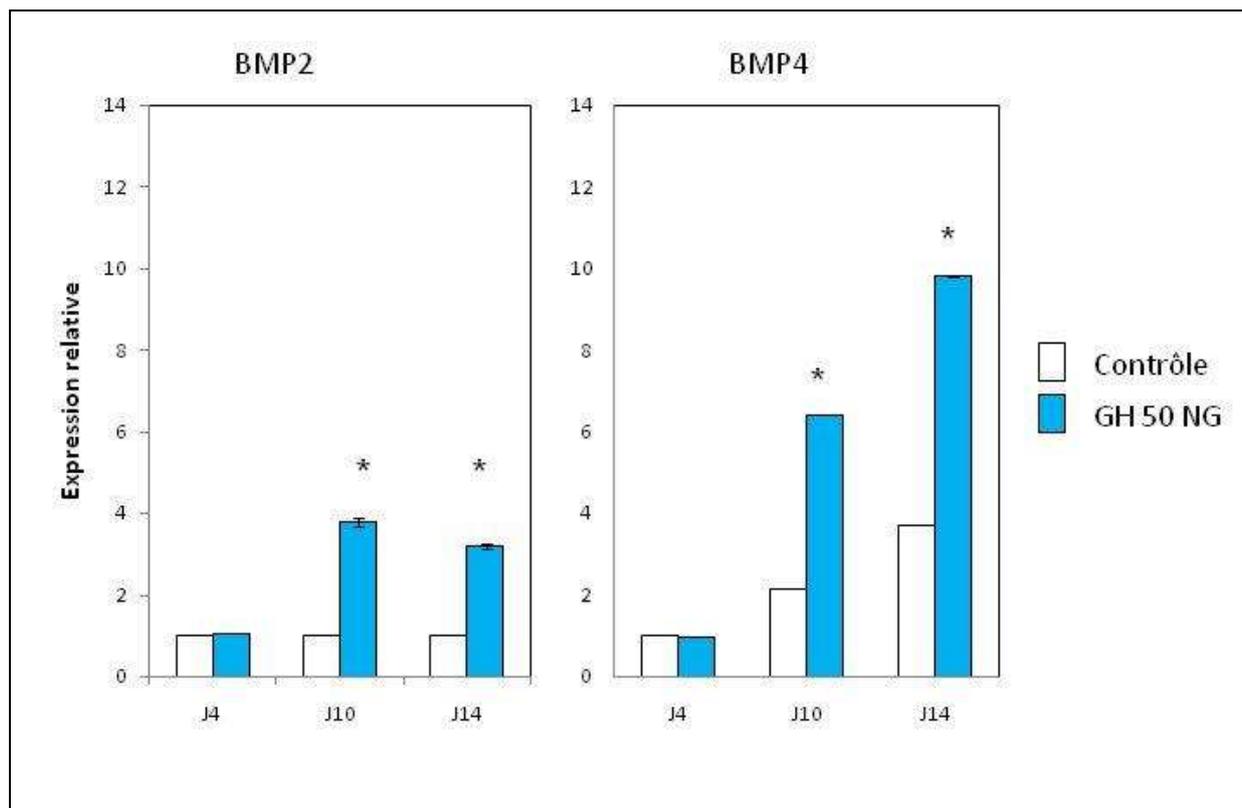


Figure 3.16 : Etude par PCR quantitative de l'effet de la GH sur deux facteurs de transcription impliqués dans la différenciation odontoblastique : BMP2 et BMP4. Les résultats d'une expérimentation représentative sont montrés.

Nos résultats de RT-PCR en temps réel indiquent que la GH stimule l'expression de BMP2, BMP4 à J10 et à J14.

Il est intéressant de noter que l'expression basale de BMP2 reste stable de J4 à J14 alors que l'expression du transcrit de BMP4 dans les conditions contrôles augmente de J4 à J14.

L'ensemble de ces résultats indique, pour la première fois, que la GH stimule la différenciation des M2H4. Ces résultats démontrent un rôle de l'hormone de croissance dans la différenciation des M2H4. La GH pourrait donc agir à différents niveaux. Après fixation sur son récepteur' la GH peut directement activer l'expression de certains marqueurs odontoblastiques comme DMP1. D'autre part la GH pourrait jouer un rôle indirect dans la différenciation odontoblastique en activant différents facteurs parmi lesquels, BMP2 et BMP4 ou IGF1 qui agiraient alors en stimulant la différenciation odontoblastique.

En conclusion, les cellules M2H4 sont des cellules cibles de la GH. La GH se fixe sur son récepteur présent à la surface des cellules M2H4 et active les voies de signalisation STAT-5 et ERK 1,2. La fixation de la GH sur son récepteur stimule également l'expression d'IGF1. La GH active la prolifération cellulaire et est impliquée dans l'expression de différents marqueurs impliqués dans la différenciation odontoblastique.

3.5. Discussion et Conclusions

Le but de notre étude était d'apporter des éléments nouveaux sur le rôle de la GH dans la dentinogenèse et ses mécanismes d'action sur les odontoblastes, *in vitro*.

Au sein de notre laboratoire, nous avons développé un modèle primaire de culture de cellules pulpaire humaines (Alliot-Licht *et al*, 2001, Alliot-Licht *et al* 2005, Lopez-Cazaux *et al*, 2006). Ces cellules expriment le récepteur de la GH. Nous avons décidé de ne pas utiliser ce modèle de culture en première intention, tout d'abord à cause de son hétérogénéité : plusieurs types cellulaires à différents stades de différenciation sont présents. D'autre part les conditions de culture pauvre en sérum (2%) pour diminuer l'apport non contrôlable de GH par le sérum de veau fœtal contre indique l'utilisation de notre modèle pulpaire mis au point avec 10% de SVF. Enfin, notre modèle de culture de cellules pulpaire humaines est issu de la mise en culture de la pulpe de dents de sagesse de patients âgés de 15 à 20 ans chez lesquels le niveau d'hormone de croissance est très élevé ce qui pourrait influencer nos résultats.

Nous avons donc décidé de travailler chez l'animal en utilisant une lignée odontoblastique. Même si l'utilisation de ces lignées est controversée car les odontoblastes sont des cellules post mitotiques, les lignées cellulaires présentent différents intérêts (Hanks *et al*, 1998). Elles synthétisent un grand nombre de molécules (DSPP, DMP1...) et permettent d'étudier leur rôle dans la dentinogenèse. Elles sont aussi utilisées pour examiner les effets de cytokines sur la fonction cellulaire et sur la dentinogenèse et pour tester des matériaux dentaires (Hanks *et al*, 1998). Différentes lignées odontoblastiques ont été développées (Hank *et al*, 1998 ; MacDougall, 1998a *et al* ; Ritchie *et al*, 2002 ; Priam *et al*, 2005 ; Arany *et al*, 2006). Nous avons eu l'opportunité de travaillé sur les cellules M2H4 et nous avons donc choisi ce modèle cellulaire afin d'étudier les mécanismes d'action de la GH.

Dans le tissu osseux, la GH sécrétée par l'adénohypophyse peut agir en se fixant sur son récepteur spécifique situé à la surface des cellules ostéoblastiques (Takahashi *et al*, 1999) et active ainsi différentes voies de signalisation (voir schéma 3.2). Lors du développement de l'organe dentaire chez le rat, l'expression du récepteur à la GH a été montrée par immunohistologie dans les améloblastes, les odontoblastes et les cémentoblastes à différents stades de leur différenciation cellulaire (Joseph *et al*, 1994 ; Young *et al* 1995; Zhang *et al*, 1992). Dans un premier temps, nous nous sommes assurés que les cellules M2H4 sont un bon modèle pour étudier le rôle de la GH dans la différenciation odontoblastique, en montrant l'expression du GHR dans ce modèle de culture. Mais la présence d'un récepteur à la surface d'une cellule ne suffit à prouver que la cellule peut être une cible et la fonctionnalité d'un récepteur doit être prouvée par l'activation de ces voies de signalisations. Dans le tissu osseux, de nombreuses études ont mis en évidence l'activation des voies de signalisations STAT 1, 3 et 5a et b par la GH (pour revue, voir Giustina *et al*, 2008). Chez le rat, des marquages immunohistologiques ont montré la présence de membres de la famille JAK et STAT sur les molaires lors de la formation dentinaire, les odontoblastes exprimant notamment STAT5 (Tanase et Bawden, 1996a et 1996b). Nos travaux montrent que, la GH entraîne une stimulation de la phosphorylation de STAT5 dans les cellules M2H4.

Dans les ostéoblastes, la GH agit également en induisant la synthèse d'IGF-1 qui agit à son tour sur les ostéoblastes (Guicheux *et al*, 1998b; Olney, 2003, Giustina *et al*, 2008). Des études récentes ont pu montrer le rôle de STAT5 dans la régulation de la transcription du gène de l'IGF1 de façon GH-dépendante (Woelfle *et al*, 2003a; Woelfle *et al*, 2003b). Nous avons donc complété la vérification de la fonctionnalité du récepteur à la GH dans les M2H4 en étudiant les effets de la GH sur l'expression d'IGF1. Comme sur les ostéoblastes, nos résultats montrent que la GH augmente l'expression de l'IGF1 dans les odontoblastes M2H4.

L'action de la GH sur les cellules cibles est directe et/ou indirecte via l'Insuline Growth Factor 1 (IGF1). GH augmente la production d'IGF1 au niveau de nombreux tissus périphériques dont le foie. IGF1 agit localement par des effets paracrines au niveau des cellules cibles dans ce que l'on considère être les effets indirects de la GH médiés par IGF1 (Hennen G, 2001). Des études effectuées sur les cellules osseuses (Guicheux *et al*, 1998b; Giustina *et al*, 2008) ainsi que sur des fibroblastes de la pulpe dentaire (Li *et al*, 1998) ont pu mettre en évidence que l'effet de la GH est en parti médié par l'IGF1. Dans les M2H4, la GH induit une augmentation de l'expression du gène de l'IGF1. Ces résultats suggèrent qu'une partie des effets induits par la GH pourraient être médiés par la synthèse d'IGF1. L'utilisation

d'un anticorps bloquant l'activité biologique de l'IGF1, comme décrit précédemment (Guicheux *et al*, 1998b) permettra de vérifier cette hypothèse.

Notre étude est donc la première à montrer la présence du récepteur à la GH sur une lignée d'odontoblastes mais également que lors d'un traitement par la GH, il y a une activation de la voie STAT5 et une stimulation significative de l'expression des ARNm codant pour l'IGF1. Les M2H4 possèdent donc un récepteur fonctionnel capable de transduire un signal sous l'effet de la GH. Cette lignée est donc un modèle pertinent pour étudier les effets de l'hormone de croissance.

Nous nous sommes ensuite intéressés à l'effet de la GH sur la prolifération cellulaire. En effet la GH est connue pour stimuler la prolifération cellulaire d'ostéoblastes en culture (Morales *et al*, 2004). D'autre part, Young et coll en 1992 suggèrent une activation de la prolifération, par la GH, des odontoblastes en cours de différenciation en s'appuyant sur des études réalisées sur un modèle de rat (Lewis dwarf rat). Ces études montrent un index mitotique plus élevé en présence de GH au niveau des préodontoblastes (Young *et al*, 1992). Les M2H4 sont classiquement cultivées dans du MEM contenant 10% de SVF (Magne *et al*, 2004). Or le SFV contient des facteurs de croissance et de la GH, et nous avons décidé de cultiver nos cellules avec une faible quantité de sérum (2%). Nous avons tout d'abord mis en évidence que les M2H4 sont capables de proliférer avec 2% de SVF. Dans ces conditions de culture pauvre en sérum, la GH stimule la prolifération cellulaire des cellules M2H4 de façon dose dépendante. De plus, nos travaux apportent des éléments nouveaux sur les mécanismes à l'origine de la stimulation de la prolifération des M2H4. En effet nous avons pu mettre en évidence par western blot une activation de la forme phosphorylée de ERK1/2 par un traitement à la GH et en présence de l'inhibiteur spécifique de la voie ERK (U0126) l'effet prolifératif de la GH est supprimé. Ces résultats montrent pour la première fois que la GH stimule de façon dose dépendante la prolifération d'une lignée d'odontoblastes et que cette stimulation est annulée par l'ajout d'un inhibiteur de la voie ERK1/2. Des résultats similaires ont été obtenus dans d'autres types cellulaires où ERK est impliqué dans la prolifération cellulaire (Lai *et al*, 2001).

Dans le tissu osseux, parallèlement à la prolifération cellulaire, la GH agit également sur la différenciation cellulaire. Elle stimule notamment l'expression de l'ALP, de l'OC et du collagène de type I par des cellules ostéoblastiques (Rosen *et al*, 1995 ; Chihara *et al*, 1997;

Morales *et al*, 2004 ; Giustina *et al*, 2008). Sur les tissus dentaires, la GH est également décrite comme ayant un rôle. Chez les rats hypophysectomisés, un traitement à la GH permet de restaurer la production dentinaire (Hansson *et al*, 1978). Chez les rats Lewis dwarf (modèle de rat déficients en GH), la quantité de décorine et de biglycan sécrétée dans la matrice dentinaire avant l'amélogénèse diminue. La sécrétion de ces deux protéoglycanes peut être restaurée par un traitement par la GH (Zhang *et al*, 1995).

Nous nous sommes donc intéressés aux effets de la GH sur l'expression de marqueurs de différenciation des odontoblastes dans notre modèle de culture.

Nous nous sommes d'abord focalisé sur Runx2 facteur de transcription impliqué de façon précoce et tardive dans la différenciation odontoblastique (Chen *et al*, 2005; Gaikwad *et al*, 2001a; Gaikwad *et al*, 2001b). Nos résultats montrent qu'en présence de GH, l'expression de Runx2 est augmentée de façon significative en comparaison avec le contrôle. Ces résultats semblent indiquer que Runx2 serait impliqué dans la différenciation odontoblastique stimulée par la GH.

Nous nous sommes ensuite intéressés à l'expression de DMP1 marqueur le plus souvent utilisé dans les études sur la différenciation odontoblastique (Narayanan *et al*, 2001). Nos résultats montrent que l'expression basale de DMP1 augmente au cours du temps, de J4 à J10 puis se stabilise de J10 à J14. Ces résultats sont en accord avec le profil d'expression de DMP1 obtenu lors des travaux de caractérisation des M2H4 précédemment réalisés dans notre laboratoire (Magne *et al*, 2004) malgré le fait que nos conditions de cultures soient pauvres en sérum (2%). Dans ces conditions expérimentales particulières, les M2H4 ont donc conservé un phénotype odontoblastique. Nos résultats montrent également que le traitement GH provoque une augmentation de l'expression de DMP1. Or DMP1 est une protéine dentinaire majeure sécrétée au niveau du front de minéralisation et impliquée dans la minéralisation de la matrice dentinaire (He *et al*, 2003). La GH pourrait donc favoriser la minéralisation de la dentine par le biais de la synthèse de DMP1. D'autre part des études récentes ont montré que parallèlement à son rôle de protéine structurale de la matrice extra cellulaire, DMP1 serait un facteur de transcription impliqué dans la différenciation des odontoblastes. Durant les premiers stades de la différenciation, DMP1 est localisé dans le noyau des odontoblastes. Ceci lui permet de réguler l'expression du gène DSPP en se fixant sur son promoteur lui permettant ainsi d'activer la transcription de ce gène (Narayanan *et al*, 2006). L'hormone de croissance pourrait donc favoriser la différenciation des odontoblastes en stimulant l'expression de ce facteur de transcription.

La DSPP, comme DMP1, est un facteur majeur de la différenciation odontoblastique. Dans notre étude, nous n'avons pas pu étudier l'effet d'un traitement GH sur l'expression du transcrite de la DSPP. En effet dans nos conditions de culture, avec 2% de sérum et sans adjonction de phosphate inorganique, les M2H4 n'expriment pas le transcrite de DSPP.

D'autre part, nous avons étudié l'effet de la GH sur l'expression de BMP2 et BMP4, deux facteurs fortement impliqués dans la différenciation odontoblastique et la formation de la dentine (Nie *et al*, 2005). BMP4 agirait de façon précoce et BMP2 de façon plus tardive. En effet, BMP4 est exprimé par les préodontoblastes et son expression diminue après la différenciation odontoblastique alors que BMP2 est exprimé pendant la différenciation terminale des odontoblastes (Nie *et al*, 2005). Nos résultats montrent que les M2H4 expriment BMP2 et BMP4 de façon différente (l'expression de BMP4 augmentant avec le temps de culture) et que la GH induit une augmentation de l'expression de ces deux facteurs. Nos résultats sont en accord avec les travaux de Li en 1998, qui dans un modèle de cellules fibroblastiques issues de pulpe de dents de sagesse humaines montrent par RT-PCR, une augmentation de l'expression de BMP2 et BMP4 par un traitement par la GH (Li *et al*, 1998). L'étude du niveau d'expression de ces protéines par Western blot devra être réalisée pour confirmer l'effet de la GH sur l'expression de BMP2 et BMP4.

L'ensemble de nos résultats de PCR quantitative en temps réel montrent pour la première fois que la GH induit une stimulation de la différenciation des M2H4. La GH pourrait agir à différents niveaux. Après fixation sur son récepteur la GH peut directement activer l'expression de certains marqueurs odontoblastiques comme DMP1. D'autre part la GH peut jouer un rôle indirect dans la différenciation odontoblastique en activant différents facteurs parmi lesquels IGF1, Runx2, BMP2 et BMP4.

En conclusion, cette étude montre pour la première fois la présence du récepteur de l'hormone de croissance sur une lignée odontoblastique. La GH stimule 1°: la prolifération cellulaire des M2H4 et 2°: la différenciation cellulaire. Ces résultats confirment que les odontoblastes sont des cellules cibles pour l'hormone de croissance. Un déficit en GH, un traitement substitutif à la GH, un gigantisme lié à la GH devraient donc avoir un effet sur la dentinogenèse chez l'homme. Cependant, *in vivo*, aucune incidence dentinaire n'est décrite dans les cas d'insuffisance ou d'excès de GH chez l'homme. Cette absence de phénotype dentinaire peut s'expliquer par le manque d'étude sur ce sujet ou pourrait être expliquée par le fait de BMP2 et BMP4 ou d'IGF1. En effet ces facteurs jouant un rôle important dans la différenciation odontoblastique et la dentinogenèse (Lesot *et al*, 2001, Nie *et al*, 2006), l'effet du manque ou

de l'excès de GH pourrait être atténué et/ou masqué par ces molécules qui pourraient prendre le relais.

Des études cliniques permettraient d'apporter des éléments nouveaux sur la dentine formée lors d'un trouble de la sécrétion de l'hormone de croissance. Notre objectif aujourd'hui est d'étudier l'épaisseur de dentine chez des enfants atteints de nanismes hypophysaire ou d'acromégalie pour envisager une prise en charge spécifique de ces enfants dans le cas d'anomalies dentinaires.

IV. Annexes

Publications en rapport avec la thèse

CULTURE MEDIUM MODULATES THE BEHAVIOUR OF HUMAN DENTAL PULP-DERIVED CELLS: TECHNICAL NOTE

S Lopez-Cazaux¹, G Bluteau¹, D Magne¹, B Lieubeau², J Guicheux^{1*} and B Alliot-Licht¹

¹INSERM EM 9903, Research Center on Materials with Biological Interest, School of Dental Surgery, 1 Place Alexis Ricordeau, 44042 Nantes cedex 1, France; ²IECM/UMR INRA 707, National Veterinary School, Atlanpole, la Chantrerie, BP 40706, 44307 Nantes cedex 3, France

Abstract

In vitro approaches have extensively been developed to study reparative dentinogenesis. While dental pulp is a source of unidentified progenitors able to differentiate into odontoblast-like cells, we investigated the effect of two media; MEM (1.8mM Ca and 1mM Pi) and RPMI 1640 (0.8mM Ca and 5mM Pi) on the behaviour of human dental pulp cells. Our data indicate that MEM significantly increased cell proliferation and markedly enhanced the proportion of α -smooth muscle actin positive cells, which represent a putative source of progenitors able to give rise to odontoblast-like cells. In addition, MEM strongly stimulated alkaline phosphatase activity and was found to induce expression of transcripts encoding dentin sialophosphoprotein, an odontoblastic marker, without affecting that of parathyroid hormone/parathyroid hormone related protein-receptor and osteonectin. In conclusion, these observations demonstrate that not only proliferation but also differentiation into odontoblast-like cells was induced by rich calcium and poor phosphate medium (MEM) as compared to RPMI 1640. This study provides important data for the determination of the optimal culture conditions allowing odontoblast-like differentiation in human pulp cell culture.

Key Words: Dental pulp, Smooth muscle actin, Odontoblast-like cell differentiation, Cell culture

Introduction

Dental pulp is a loose connective tissue that provides dentinogenic, nutritive, sensory, and defensive functions to the tooth (Tziafas *et al.*, 2000). Dental diseases and injuries require replacement of the affected dental tissue. Traditional therapies with calcium hydroxide as a pulp-capping agent are successfully used to induce a reparative dentinogenic response (Goldberg and Smith, 2004). However, the current rapid progression in stem cell research has enhanced our knowledge of dental tissue regeneration and the major goal of dental research today is the development of biological approaches to promote this regeneration of dental tissues (Krebsbach and Robey, 2002; Seo *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2005). In this context, culture of pulp cells appears as a promising tool to ensure the dental tissue regeneration (Bohl *et al.*, 1998; Mitsiadis and Rahiotis, 2004). In culture, dental pulp cells are able to synthesize a specific matrix resembling dentin (Kasugai *et al.*, 1993; Panagakos, 1998; Shiba *et al.*, 1998; Onishi *et al.*, 1999; About *et al.*, 2000; Couble *et al.*, 2000; Zhang *et al.*, 2005). These cells are usually cultured in Eagle's basal medium, MEM, α -MEM or D-MEM and the supplementation with β -glycerophosphate or dexamethasone is a prerequisite to observe odontoblast-like differentiation, nodule formation and mineralization. However, we recently described a model of human pulp cells cultured in RPMI 1640 in which the formation of mineralized nodules was observed without supplementation (Alliot-Licht *et al.*, 2001). The progenitor cells capable of commitment into odontoblast-like cells that produce reparative dentine after injury as well as the cells that differentiate in odontoblast-like in culture are not yet identified. It is suggested that odontoblast-like progenitors derive from a perivascular niche within dental pulp (Shi and Gronthos, 2003) and recently, Tecles and co-authors clearly demonstrated that perivascular progenitor/stem cells can proliferate in response to dentin injury (Tecles *et al.*, 2005). In human as well as in porcine dental pulp cultures, α -smooth muscle actin-positive (SMA+) cells, identified as vascular-derived pericytes, were observed (Gronthos *et al.*, 2000; Alliot-Licht *et al.*, 2001; Brock *et al.*, 2002; Shi and Gronthos, 2003). However, at the moment no information is available on the potential effect of medium on the expression of SMA in dental pulp cultures. RPMI 1640 exhibit different characteristics compared with MEM in which human dental pulp cells are usually cultured. RPMI 1640 contains a higher concentration in phosphate (5 mM) and a lower concentration in calcium (0.8 mM) than MEM a less nutrient-rich medium containing 1.8 mM of calcium and

*Address for correspondence:

Dr Jerome Guicheux, Ph.D.
INSERM EM 9903,
Research Center on Materials with Biological Interest,
School of Dental Surgery,
1 Place Alexis Ricordeau,
44042 Nantes cedex 1,
France

Telephone (office) : +33(0)240412919
Telephone (secretary) : +33(0)240412916
Fax : +33(0)240083712
E-mail: jerome.guicheux@nantes.inserm.fr

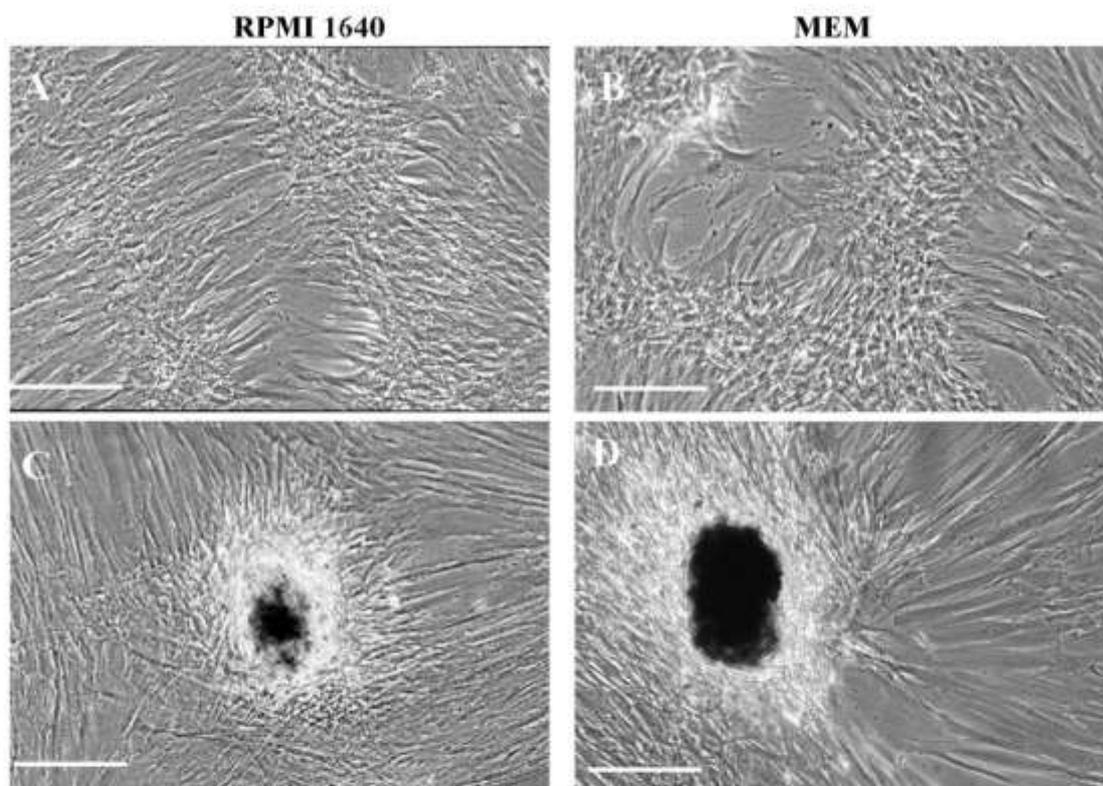


Figure 1: Morphology of human dental pulp cells maintained in RPMI 1640 (A, C) or MEM (B, D) for 20 days (A, B) and 30 days (C, D) as described in Materials and Methods. Standard phase contrast photomicrographs illustrate the various cellular features, i.e. cell retraction with a hill-and-valley organization (A, B) and multicellular nodules (C, D). Bar = 100µm.

3550 microplate Reader).

ALP activity was corrected for the total protein content (determined by the Bradford method using BSA as a standard) and was expressed as nMoles of paranitrophenol/min/mg of protein.

Total RNA isolation

The expression of various dentin and bone related transcripts were assessed by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). Total RNA was extracted from human pulp cells seeded in 25 cm² flasks. After 14 days in culture, media (MEM or RPMI 1640) were removed. The cell layers were rinsed with RNase free PBS and stored at -80°C. Total RNA was extracted using Trizol according to the manufacturer's instructions. Briefly, lysis of the cells in Trizol was followed by centrifugation at 12,000 g, 4°C for 15 minutes in the presence of chloroform. The upper aqueous phase was collected and the RNA was precipitated by addition of isopropanol and centrifugation at 12,000 g, 4°C for 10 minutes. RNA pellets were washed with cold 75% ethanol, dried, reconstituted with sterile water, and quantified by spectrometry.

RT-PCR

After DNase I digestion, RNA samples (2µg) were reverse transcribed using AMV-RT and random hexamers in a total

volume of 30 µl. Template cDNAs (2.5µl) were then amplified in a typical PCR reaction: 2.5µl buffer 10x (20 mM Tris-HCl (pH 8.4), 50 mM KCl), 1 µM of the respective primers, 200 µM dNTP and 2.5 units of Taq DNA polymerase. RNA samples that had not been reverse-transcribed were included to check for the absence of DNA contamination. Primers sequences for PTH/PTHrP-receptor (PTH/PTHrPR) (Stewart *et al.*, 1999), osteonectin (ON) (Gronthos *et al.*, 1999), dentin sialophosphoprotein (DSPP) (Papagerakis *et al.*, 2002) and glyceraldehyde phosphate dehydrogenase (GAPDH) (Bluteau *et al.*, 1999) and annealing temperatures are detailed in table 1. Amplifications were carried out in an Eppendorf master cycler (VWR, Brumath, France) under the following conditions: denaturation for 3 minutes at 95°C followed by cycles of 20s denaturation at 94°C, 20s annealing at the primer specific temperature and 10s elongation at 72°C.

Statistical analysis

Data are from one representative experiment out of three performed with similar results. Results are expressed as mean ± SEM of triplicate determinations. Comparative studies of means were performed using one way analysis of variance followed by a post-hoc test (Fisher's projected least significant difference) with a statistical significance at $p < 0.05$.

1 mM of phosphate. In order to determine the culture conditions, which favour the recruitment, growth and differentiation of odontoblast-like progenitors, we sought to compare MEM and RPMI 1640 media that mainly differ by their ionic concentrations. This set of experiments underlines the importance of the experimental conditions and gains new insight in the behaviour of human dental pulp cells in culture.

Materials and Methods

Materials

Cell culture plasticware was purchased from Falcon (Becton-Dickinson, Franklin Lakes, NJ) and Corning-Costar (D. Dutscher, Brunath, France). RPMI 1640, MEM, fetal calf serum (FCS), glutamine, antibiotics, trypsin/ethylene-diamine tetraacetic acid (EDTA), bovine serum albumin (BSA), Trizol[®] reagent, DNase I and Taq DNA polymerase were obtained from Invitrogen (Cergy-Pontoise, France). Avian myeloblastosis virus-reverse transcriptase (AMV-RT), random hexamers and recombinant ribonuclease inhibitor were purchased from Promega (Charbonnières les bains, France). All other chemicals were from standard laboratory suppliers and of the highest purity available.

Cells isolation and culture

Human pulp cells were isolated and cultured as previously reported in details (Alliot-Licht *et al.*, 2001). Briefly, human non-erupted third molars were extracted at the root development stage for clinical reasons, under general anaesthesia from healthy young people (14 to 25 years old) who gave their informed consent. The teeth were immediately cracked opened and the coronal pulp tissue was removed, minced into explants (<1 mm³) and placed in wells containing MEM or RPMI 1640 medium supplemented with 1% glutamine, penicillin/streptomycin (100 IU/ml-100 µg/ml), amphotericin-B (10 µg/ml) and 10% FCS in a humidified atmosphere of 95% air and 5% CO₂ at 37°C. The standard medium was removed every two days. After one month, and then every 15 days, cells were collected by trypsinization and seeded at a density of 2x10⁴ cells/cm² in complete medium (RPMI 1640 or MEM). For all sets of experiment, cells were used at the third passage. Data presented herein are representative of experiments with pulp from 9 different donors.

Cell proliferation

The effect of medium on the proliferation of human dental pulp cells was monitored by quantifying DNA synthesis through the incorporation of [³H] thymidine. Cells were seeded at 30,000 cells per well (24-well plates) and cultured in complete MEM or RPMI 1640 for the indicated times. Four hours prior to assaying, half of the medium was replaced by fresh medium containing [³H] thymidine (1 µCi/ml) (APB, Saclay, France). After rinsing with PBS, cells were fixed for 15 minutes in 95% methanol. Sample were then dehydrated for 5 minutes at 37°C and incubated for one hour in 1 ml of NaOH (0.1N). Radioactivity uptake was finally counted in a β-scintillation counter (Beckman,

LS 6 000SC). In order to provide an equivalent ratio of proliferation stimulating factors for each time of the experiment, half of the medium was changed in all other wells. Cell counts were performed after trypsinization with a haemocytometer using the trypan blue exclusion method. Results of cell proliferation were finally expressed as cpm per 1000 cells.

Immunofluorescent labeling and flow cytometric analysis

On day 4 after being seeded on cover glasses, cells were washed twice with PBS, fixed in 4% paraformaldehyde solution for 1 h at 4°C and washed for 20 min in washing buffer (PBS containing 3% BSA). Cells were then incubated for 15 minutes in PBS containing 0.1% Triton X-100 to permeabilize the cell membranes, and for a further 30 min at 37°C with the monoclonal anti-SMA antibody (mouse IgG_{2b}) (Sigma). After rinsing with PBS, cells were incubated for 1h at 37°C with an appropriate FITC-conjugated goat anti-mouse IgG antibody (Sigma) and washed extensively with PBS. Negative controls were processed in the same way except that the first antibody was permuted with an isotype-matched negative control antibody IgG_{2b} (Sigma). The cover glasses were finally examined under a fluorescent-light microscope (Olympus BX60).

Flow cytometric analysis of SMA expression was carried out on human pulp cells seeded at a density of 10⁶ cells in 75 cm² flasks and cultured in complete MEM or RPMI 1640, for 14 days. Cells were released using trypsin/EDTA, washed in PBS and counted. 5x10⁵ cells were aliquoted and fixed with paraformaldehyde (4%) for 30 minutes. Cell membranes were permeabilized with triton X-100 (0.025%) for 15 minutes and then rinsed twice with PBS. After blocking with human AB serum (Blood Transfusion Center, University Hospital, Nantes, France) for 15 minutes, cells were incubated consecutively with the same first and second antibodies as those used for immunocytochemistry. Finally, cells were washed twice in PBS on ice and resuspended in 100 µl of paraformaldehyde (4%). Analyses of fluorescent cells based on the reading of 5,000 events were performed with a FACScalibur using Cell-Quest software program (Beckton Dickinson, San Diego, Ca). Results were expressed as percentage of SMA positive cells in a typical histogram profile. The regions were set to the reactivity levels obtained with the isotype-matched negative control antibody.

Alkaline phosphatase activity (ALP)

Cells were seeded in 6-well plates at a density of 10⁵ cells per well and cultured in complete MEM or RPMI 1640. After 14 days in culture, cell layer was rinsed with PBS, scraped into 1 ml of buffer (10mM Tris-HCl, 5mM MgSO₄, 0.1% Triton X100, 0.1% NaNO₂), frozen (-20°C) and thawed 3 times, sonicated for 5 minutes to disrupt cell membranes and centrifuged (4,000g) at 4°C for 15 minutes. ALP activity was determined by the hydrolysis of *p*-nitrophenyl phosphate in 2-amino-2-methyl-1-propanol buffer (pH 10.4) at 37°C for 30 minutes. Absorbance at 405 nm was measured with a spectrophotometer (Bio-Rad

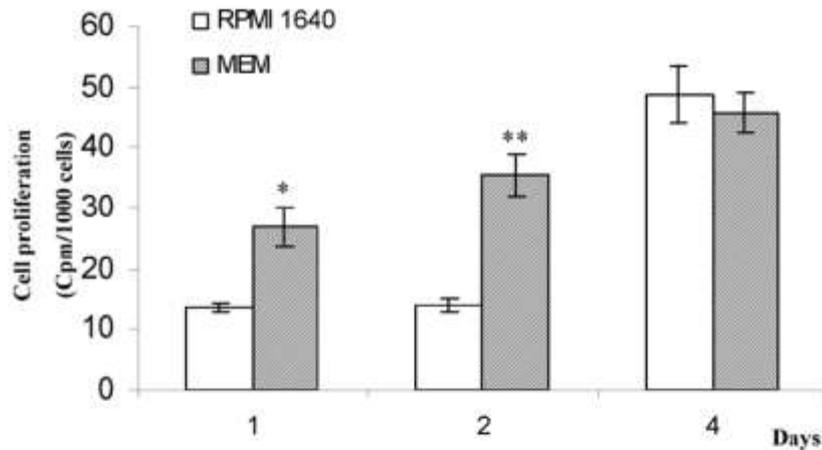


Figure 2: Effect of media on human dental pulp cell proliferation. Cells were cultured in RPMI 1640 or MEM for the indicated times and analyses were performed as described in *Materials and Methods*. [³H] thymidine incorporation have been standardized to cell numbers (cpm/1000 cells). Results are expressed as mean +/- SEM of triplicate determination. Results of one representative experiment are shown; *, $p < 0.05$ and **, $p < 0.01$ as compared to RPMI 1640.

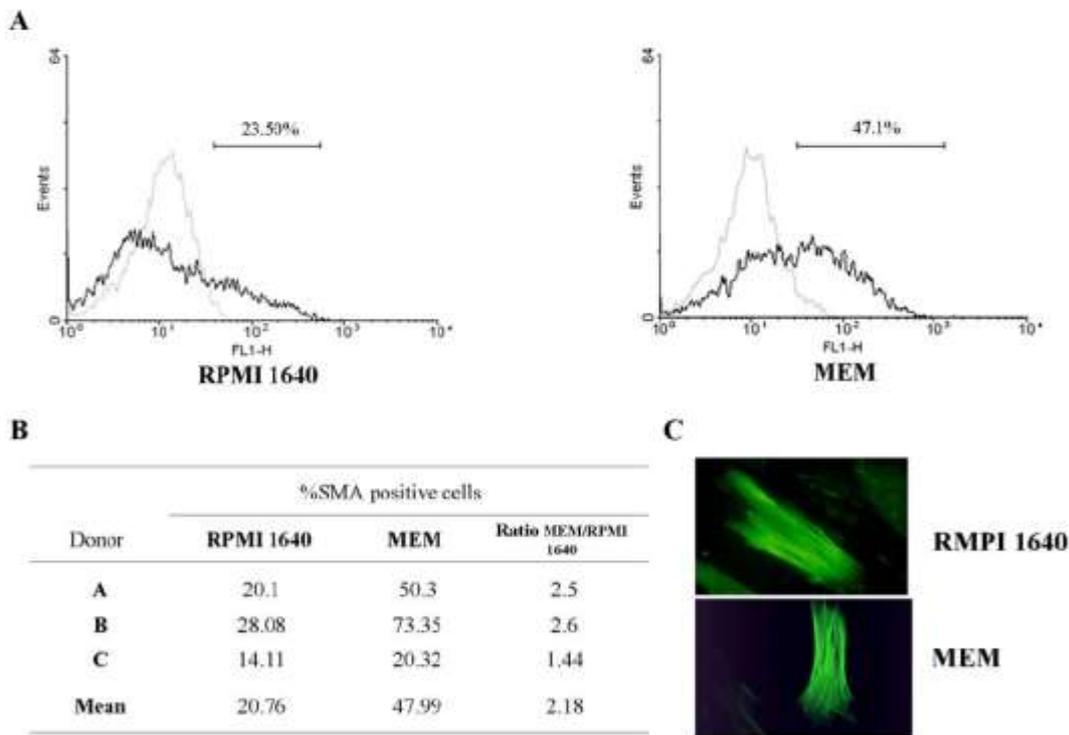


Figure 3: Effect of media on the number of SMA⁺ cells in human dental pulp cultures after 14 days in RPMI 1640 or MEM. (A) Flow cytometric data are shown as typical histograms of fluorescence intensity following labeling of cells with SMA (dark line) or an isotype matched control antibody (gray line). The bars defining the SMA⁺ cells were set on each histogram. The percentage of SMA-labeled cells is given in each condition. Results from one representative experiment are shown. FL1-H = fluorescence intensity. (B) Quantitative analysis of SMA positive cells. Data obtained with three different donors are presented, (C) α -smooth muscle actin (SMA) feature in human dental pulp cells. Cells were cultured for 4 days in RPMI 1640 or MEM prior to immunostaining as described in *Materials and Methods*. Bar = 25 μ m.

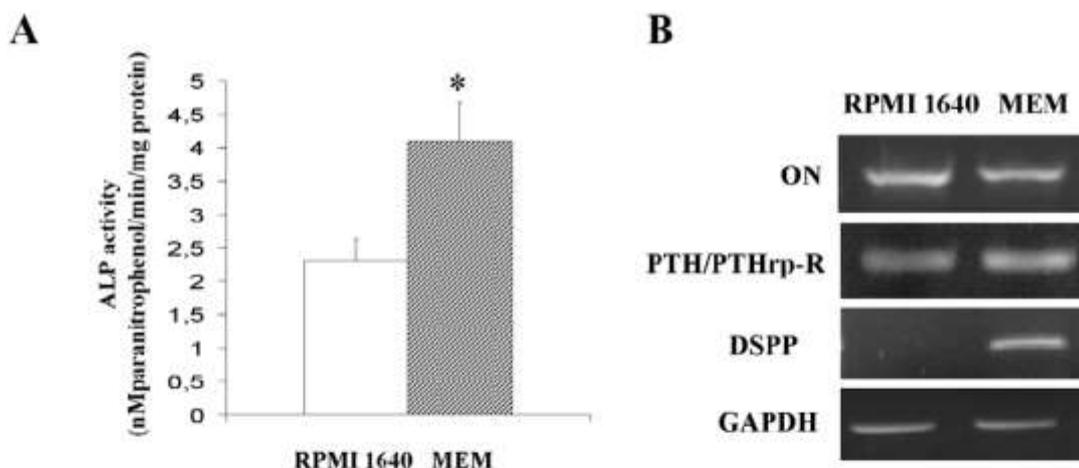


Figure 4: Effect of media on ALP activity and expression of related transcripts in human dental pulp cells. **A:** ALP activity. Cells were cultured with RPMI 1640 or MEM for 14 days as described in *Materials and Methods*. Experiments were done in triplicate and results are expressed as mean \pm SEM ($*p < 0.05$ as compared to RPMI 1640). **B:** Expression of parathyroid hormone/parathyroid hormone-related protein-receptor (PTH/PTHrp-R), osteonectin (ON), and dentin sialophosphoprotein (DSPP) transcripts in human dental pulp cells. Cells were cultured for 14 days with RPMI 1640 or MEM, prior to RT-PCR analysis as described in *Materials and Methods*. A representative agarose gel is shown.

Results

Human pulp cells in culture

Cells growing in both media (MEM and RPMI 1640) presented a similar morphology. Cell retractions forming distinct hill-and-valley-type of morphology (Fig. 1A, B) and multicellular foci or nodules (Fig. 1C, D) were observed. This cellular organization was previously described in cultures of microvascular pericytes (Proudfoot *et al.*, 1998).

Effect of media on cell proliferation

Results concerning the rate of [3 H] thymidine incorporation in human pulp cells cultured with MEM or RPMI 1640 are shown in figure 2. Thymidine incorporation was significantly higher in MEM than in RPMI 1640 after one and two days in culture, i.e. 2 and 2.5-fold increase, respectively.

Effect of media on the percentage of SMA+ cells

The SMA+ cells are considered as a possible source of odontoblast-like cells (Miura *et al.*, 2003; Shi and Gronthos, 2003). To investigate the effects of media on this pericyte marker, we assessed the number of SMA+ cells in our two culture conditions by flow cytometry. A typical histogram of one representative donor is shown in Fig 3A. Values obtained from three donors are presented in Fig 3B. For statistical analysis, values obtained with RPMI 1640 were standardized to 100% and compared with respective MEM conditions. Our results indicate that MEM induced a significant 2-fold increase ($p < 0.05$) in the percentage of SMA+ cells compared to RPMI 1640 (Fig. 3B). Immunofluorescent staining confirmed the presence of SMA+ cells when human dental pulp cells were cultured

in MEM as well as in RPMI 1640 (Fig. 3C).

Effect of media on cell differentiation

The increase in ALP activity is a common feature of osteoblastic and odontoblastic differentiation. ALP activity in human dental pulp cells was markedly stimulated by MEM. A two-fold increase was observed after 14 days as compared to culture in RPMI 1640 (Fig. 4A).

To strengthen the above data, we analyzed the effects of media on the steady-state level of mRNA encoding various osteo/odontoblastic markers (PTH/PTHrp-receptor, ON, and DSPP) (Fig. 4B). Human dental pulp cells were found to express mRNAs encoding PTH/PTHrp receptor and ON in the two culture conditions. While expression of these two markers remained unchanged, we found that MEM induced expression of DSPP (Fig. 4B). This result strongly suggests that MEM promoted differentiation of at least one unidentified subpopulation of dental pulp cells towards an odontoblastic phenotype. GAPDH was used as an internal control and remained unchanged.

Discussion

Engineering oral tissues using dental pulp cells is viewed as having promising clinical potential and could provide an alternative to the traditional therapy (Bohl *et al.*, 1998; Gronthos *et al.*, 2000; Murray *et al.*, 2002; Zhang *et al.*, 2005). Indeed, dental pulp stem cells obtained from third molar or from exfoliated deciduous teeth were identified by their capacity to form clonogenic cell clusters (colony-forming units fibroblasts; CFU-F) and to differentiate into various cell types, including but not limited to osteoblasts/

odontoblasts, adipocytes and neural cells (Gronthos *et al.*, 2000; Shi *et al.*, 2001; Gronthos *et al.*, 2002; Krebsbach and Robey, 2002; Miura *et al.*, 2003). When dental pulp stem cells are mixed with calcium phosphate scaffolds and transplanted subcutaneously into immunocompromised mice, they formed dentin/pulp complex (Gronthos *et al.*, 2002; Batouli *et al.*, 2003; Miura *et al.*, 2003). Rat dental pulp cell populations containing stem cells exhibit the ability to differentiate into odontoblast-like cells in cultured and Zhang and co-authors revealed that this odontogenic properties is not altered when cells are cultured on three-dimensional calcium phosphate as well as titanium scaffold (Zhang *et al.*, 2005). In this context, we aimed at determining which medium could favour growth and differentiation of odontoblast-like progenitors in human dental pulp cultures.

Because it was described that the medium can influence the cell population in cultures of bovine pulp cells (Nakashima, 1991), we firstly sought to investigate the effects of two different media (MEM and RPMI 1640) on cellular morphology and nodule formation. Interestingly, cells derived from human dental pulp exhibited comparable morphological features and nodules were observed in both media. In addition, based on the rate of ^3H thymidine incorporation, our results indicate that MEM is more potent in stimulating cell proliferation than RPMI 1640. One of the main differences between MEM and RPMI 1640 is their relative calcium and phosphate contents. In this range of ionic concentration, a recent study indicates that a gradual increase (0–4mM) in calcium concentration promotes osteoblastic cell proliferation (Maeno *et al.*, 2005). In view of this above mentioned study, it is reasonable to speculate that the higher concentration of calcium in MEM could favour dental pulp cell proliferation. At all events, our results are in agreement with a comparative study dealing with the effects of various media on bovine dental pulp cells (Nakashima, 1991).

Dental pulp cultures containing stem cells were found to express CD146 a marker of smooth muscle cells, endothelial cells and pericytes, implying that these cells may have originated from a perivascular microenvironment (Miura *et al.*, 2003; Shi and Gronthos, 2003). In addition, transplantation of CD146 positive specific population isolated from dental pulp stem cells into immunocompromised mice, allow the formation of dentin and pulp tissue (Shi and Gronthos, 2003). The finding of this study defines distinct primitive stem cell populations associated with the blood vessels of pulp tissue that express CD146 with preodontogenic potential (Shi and Gronthos, 2003). Interestingly, 85% of the isolated CD146 positive cells express α -smooth muscle actin (SMA) (Shi and Gronthos, 2003). The presence of SMA positive cells was previously described in porcine dental pulp cultures (Brock *et al.*, 2002) and in dental human pulp cultures (Gronthos *et al.*, 2000; Alliot-Licht *et al.*, 2001; Alliot-Licht *et al.*, 2005). While RPMI 1640 affects cell growth to a lesser extent than MEM, it has been successfully used for the culture of human pulp cells (Alliot-Licht *et al.*, 2001). For that reason, we next explored the effects of media on the proportion of cells expressing SMA. As previously reported (Alliot-Licht *et al.*, 2001; Alliot-Licht *et al.*, 2005),

we evidenced SMA+ cells in human pulp cultures with RPMI 1640. Moreover, the presence of SMA+ cells in cultures with MEM was not surprising because SMA+ cells were recently reported in human pulp cells cultured in α -MEM (Gronthos *et al.*, 2000) and in porcine dental pulp cells cultured in DMEM F12 medium (Brock *et al.*, 2002). Interestingly, in our model of human dental pulp culture that contains cells at various stages of differentiation (Alliot-Licht *et al.*, 2005), our results demonstrated that a calcium-rich and phosphate-poor medium (MEM) supports recruitment and/or proliferation of SMA+ cells in human dental pulp cultures. This data therefore appears in agreement with previous reports, which showed that MEM could be successfully employed in culture of cells expressing smooth muscle cell markers (pericytes or calcifying vascular cells). Indeed, these cells routinely cultured in MEM spontaneously formed multicellular nodules that mineralized without exogenous factors (Schor *et al.*, 1995; Proudfoot *et al.*, 1998; Canfield *et al.*, 2000). However, in order to explain the lower proportion of SMA+ cells in RPMI 1640 medium, we can hypothesize that the high phosphate concentration (5mM) had induced a phenotypic transition characterized by a loss of α -smooth muscle actin as previously described in bovine aortic smooth muscle cells (Steitz *et al.*, 2001).

To investigate whether media may affect cellular differentiation, we next assessed alkaline phosphatase activity. This enzyme is widely used as a marker of calcified tissue derived cells such as odontoblasts (Goseki *et al.*, 1990; Onishi *et al.*, 1999). Our results demonstrated that MEM induces a higher ALP activity compared to RPMI 1640. Because at day 14, the amount of total proteins was not different between both conditions (data not shown), the variation noted in ALP activity is likely to be related to the specific activity of this enzyme. The elevated concentration of calcium in MEM medium could be responsible for this enhancement of ALP activity. Although a previous study in bone cells evidenced an increase in ALP activity in a low-calcium environment (Yoshimura *et al.*, 1996), an up-regulation of the numbers of ALP-positive colonies was recently reported with the gradual increase in calcium concentration (0–4mM) in osteoblastic cells (Maeno *et al.*, 2005). In light of these diverging results, a specific study related to the effects of calcium and/or phosphate on human dental pulp cells is needed to gain new insights into the mechanism by which MEM favors proliferation and cellular differentiation in culture. Nevertheless, adding phosphate in MEM in the ratio which is present in RPMI 1640 and conversely, could induce a spontaneous mineral precipitation as previously described (Khouja *et al.*, 1990).

To find out whether enhancement of ALP activity in MEM culture is related to the stimulation of osteoblastic or odontoblastic differentiation, we investigated the expression of genes coding for other markers of the osteoblastic or odontoblastic phenotype. In both media, RT-PCR analysis evidenced expression of cellular markers of osteo and/or odontoblastic lineage, namely, osteonectin and PTH/PTHrP-receptor. Our experiment evidenced that the steady state level of transcripts encoding the previously mentioned markers was not influenced by the medium.

Although DSPP was described in bone and enamel (Qin *et al.*, 2002), it remains one of the most widely used odontoblastic marker (D'Souza *et al.*, 1997; Couble *et al.*, 2000; Gronthos *et al.*, 2000; Shi *et al.*, 2001; Miura *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 2005). Interestingly, DSPP mRNA expression was observed in MEM culture whereas, like in our previous report (Alliot-Licht *et al.*, 2005), the expression of DSPP was not detected when dental pulp cells were cultured in RPMI 1640. In light of these data, one can assume that MEM is able to promote odontoblastic differentiation of precursors present in human pulp cultures without an exogenous phosphate source or dexamethasone.

In conclusion, this study demonstrates that cell culture medium modulates human pulp cell behaviour. In view of our results and as compared to RPMI 1640, MEM has proved to be the more potent culture medium in terms of cellular proliferation, percentage of SMA+ cells and odontoblast-like differentiation. The main difference between these media is their calcium/phosphate contents. Consequently, because these ions are released during dentin injury or when calcium hydroxide is applied on pulp tissue (Kardos *et al.*, 1998), it could be of interest to further investigate their specific effects on cells derived from human dental pulp.

Acknowledgments

Authors gratefully acknowledge Isabelle Barbieu for technical assistance, Paul Pilet for helpful suggestion, and Isabelle Brisson for critical reading of the manuscript. This work was supported by grants from "Institut Français pour la Recherche Odontologique" (B. Alliot-Licht) and INSERM EM 9903 (J. Guicheux).

References

- About I, Bottero MJ, de Denato P, Camps J, Franquin JC, Mitsiadis TA (2000) Human dentin production *in vitro*. *Exp Cell Res* **258**: 33-41.
- Alliot-Licht B, Bluteau G, Magne D, Lopez-Cazaux S, Lieubeau B, Daculsi G, Guicheux J (2005) Dexamethasone stimulates differentiation of odontoblast-like cells in human dental pulp cultures. *Cell Tissue Res* **321**: 391-400.
- Alliot-Licht B, Hurtrel D, Gregoire M (2001) Characterization of alpha-smooth muscle actin positive cells in mineralized human dental pulp cultures. *Arch Oral Biol* **46**: 221-228.
- Batouli S, Miura M, Brahim J, Tsutsui TW, Fisher LW, Gronthos S, Robey PG, Shi S (2003) Comparison of Stem-cell-mediated Osteogenesis and Dentinogenesis. *J Dent Res* **82**: 976-981.
- Bluteau G, Labourdette L, Ronziere M, Conrozier T, Mathieu P, Herbage D, Mallein-Gerin F (1999) Type X collagen in rabbit and human meniscus. *Osteoarthritis Cartilage* **7**: 498-501.
- Bohl KS, Shon J, Rutherford B, Mooney DJ (1998) Role of synthetic extracellular matrix in development of engineered dental pulp. *J Biomater Sci Polym Ed* **9**: 749-764.
- Brock DP, Marty-Roix R, Spector M (2002) Alpha-smooth-muscle actin in and contraction of porcine dental pulp cells. *J Dent Res* **81**: 203-208.
- Canfield AE, Doherty MJ, Wood AC, Farrington C, Ashton B, Begum N, Harvey B, Poole A, Grant ME, Boot-Handford RP (2000) Role of pericytes in vascular calcification: a review. *Z Kardiol* **89**: 20-27.
- Couple ML, Farges JC, Bleicher F, Perrat-Mabillon B, Boudeulle M, Magloire H (2000) Odontoblast differentiation of human dental pulp cells in explant cultures. *Calcif Tissue Int* **66**: 129-138.
- D'Souza RN, Cavender A, Sunavala G, Alvarez J, Ohshima T, Kulkarni AB, MacDougall M (1997) Gene expression patterns of murine dentin matrix protein 1 (Dmp1) and dentin sialophosphoprotein (DSPP) suggest distinct developmental functions *in vivo*. *J Bone Miner Res* **12**: 2040-2049.
- Goldberg M, Smith AJ (2004) Cells and extracellular matrices of dentin and pulp/ a biological basis for repair and tissue engineering. *Crit Rev Oral Biol Med* **15**: 13-27.
- Goseki M, Oida S, Nifuji A, Sasaki S (1990) Properties of alkaline phosphatase of the human dental pulp. *J Dent Res* **69**: 909-912.
- Gronthos S, Brahim J, Li W, Fisher LW, Cherman N, Boyde A, DenBesten P, Robey PG, Shi S (2002) Stem cell properties of human dental pulp stem cells. *J Dent Res* **81**: 531-535.
- Gronthos S, Mankani M, Brahim J, Robey PG, Shi S (2000) Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) *in vitro* and *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**: 13625-13630.
- Gronthos S, Zannettino AC, Graves SE, Ohta S, Hay SJ, Simmons PJ (1999) Differential cell surface expression of the STRO-1 and alkaline phosphatase antigens on discrete developmental stages in primary cultures of human bone cells. *J Bone Miner Res* **14**: 47-56.
- Kardos TB, Hunter AR, Hanlin SM, Kirk EE (1998) Odontoblast differentiation: a response to environmental calcium? *Endod Dent Traumatol* **14**: 105-111.
- Kasugai S, Shibata S, Suzuki S, Susami T, Ogura H (1993) Characterization of a system of mineralized-tissue formation by rat dental pulp cells in culture. *Arch Oral Biol* **38**: 769-777.
- Khouja HI, Bevington A, Kemp GJ, Russell RG (1990) Calcium and orthophosphate deposits *in vitro* do not imply osteoblast-mediated mineralization: mineralization by betaglycerophosphate in the absence of osteoblasts. *Bone* **11**: 385-391.
- Krebsbach PH, Robey PG (2002) Dental and skeletal stem cells: potential cellular therapeutics for craniofacial regeneration. *J Dent Educ* **66**: 766-773.
- Maeno S, Niki Y, Matsumoto H, Morioka H, Yatabe T, Funayama A, Toyama Y, Taguchi T, Tanaka J (2005) The effect of calcium ion concentration on osteoblast viability, proliferation and differentiation in monolayer and 3D culture. *Biomaterials* **26**: 4847-4855.
- Mitsiadis TA, Rahiotis C (2004) Parallels between tooth development and repair: conserved molecular mechanisms following carious and dental injury. *J Dent Res* **83**: 896-902.

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

Murray PE, Lumley PJ, Smith AJ (2002) Preserving the vital pulp in operative dentistry: 2. Guidelines for successful restoration of unexposed dentinal lesions. *Dent Update* **29**: 127-134.

Nakashima M (1991) Establishment of primary cultures of pulp cells from bovine permanent incisors. *Arch Oral Biol* **36**: 655-663.

Onishi T, Kinoshita S, Shintani S, Sobue S, Ooshima T (1999) Stimulation of proliferation and differentiation of dog dental pulp cells in serum-free culture medium by insulin-like growth factor. *Arch Oral Biol* **44**: 361-371.

Panagakos FS (1998) Transformation and preliminary characterization of primary human pulp cells. *J Endod* **24**: 171-175.

Papagerakis P, Berdal A, Mesbah M, Peuchmaur M, Malaval L, Nydegger J, Simmer J, Macdougall M (2002) Investigation of osteocalcin, osteonectin, and dentin sialophosphoprotein in developing human teeth. *Bone* **30**: 377-385.

Proudfoot D, Skepper JN, Shanahan CM, Weissberg PL (1998) Calcification of human vascular cells *in vitro* is correlated with high levels of matrix Gla protein and low levels of osteopontin expression. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **18**: 379-388.

Qin C, Brunn JC, Cadena E, Ridall A, Tsujigiwa H, Nagatsuka H, Nagai N, Butler WT (2002) The expression of dentin sialophosphoprotein gene in bone. *J Dent Res* **81**: 392-394.

Schor AM, Canfield AE, Sutton AB, Arciniegas E, Allen TD (1995) Pericyte differentiation. *Clin Orthop* **313**: 81-91.

Seo BM, Miura M, Gronthos S, Bartold PM, Batouli S, Brahim J, Young M, Robey PG, Wang CY, Shi S (2004) Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament. *Lancet* **364**: 149-155.

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

Shi S, Robey PG, Gronthos S (2001) Comparison of human dental pulp and bone marrow stromal stem cells by cDNA microarray analysis. *Bone* **29**: 532-539.

Shiba H, Fujita T, Doi N, Nakamura S, Nakanishi K, Takemoto T, Hino T, Noshiro M, Kawamoto T, Kurihara H, Kato Y (1998) Differential effects of various growth factors and cytokines on the syntheses of DNA, type I collagen, laminin, fibronectin, osteonectin/secreted protein, acidic and rich in cysteine (SPARC), and alkaline phosphatase by human pulp cells in culture. *J Cell Physiol* **174**: 194-205.

Steitz SA, Speer MY, Curinga G, Yang HY, Haynes P, Aebersold R, Schinke T, Karsenty G, Giachelli CM (2001) Smooth muscle cell phenotypic transition associated with calcification: upregulation of Cbfa1 and downregulation of smooth muscle lineage markers. *Circ Res* **89**: 1147-1154.

Stewart K, Walsh S, Screen J, Jefferiss CM, Chainey J, Jordan GR, Beresford JN (1999) Further characterization of cells expressing STRO-1 in cultures of adult human bone marrow stromal cells. *J Bone Miner Res* **14**: 1345-1356.

Tecles O, Laurent P, Zygouritsas S, Burger AS, Camps J, Dejou J, About I (2005) Activation of human dental pulp progenitor/stem cells in response to odontoblast injury. *Arch Oral Biol* **50**: 103-108.

Tziafas D, Smith AJ, Lesot H (2000) Designing new treatment strategies in vital pulp therapy. *J Dent* **28**: 77-92.

Yoshimura Y, Hisada Y, Suzuki K, Deyama Y, Matsumoto A (1996) Effect of a low-calcium environment on alkaline phosphatase activity in embryonic rat calvarial bone cells in culture. *Arch Oral Biol* **41**: 41-45.

Zhang W, Walboomers XF, Wolke JG, Bian Z, Fan MW, Jansen JA (2005) Differentiation ability of rat postnatal dental pulp cells *in vitro*. *Tissue Eng* **11**: 357-368.

Discussion with Reviewers

ROC Oreffo: Do these cells maintain an undifferentiated phenotype?

Authors: Yes, it is possible to maintain the human pulp cells in culture in an undifferentiated phenotype with essential basal medium. See Couble *et al.* (2000).

ROC Oreffo: What is the effect of acidose on dental pulp cells and exogenously added calcium?

Authors: During pulp capping process, the success of calcium hydroxide is generally attribute to the alkalisation of medium surrounding the pulp healing but Kardos and co-authors reported the effect of calcium ions released by Ca(OH)₂ capping agent. The role of ionic gradient for calcium ions in facilitating repair cannot be considered in isolation and it has been suggested that calcium ions are not necessary for repair process. Cells have been able to use an influx of calcium ions across the membrane for many cellular events (mitosis, secretion, contraction or regulation of gene expression). Calcium may be regarded as an intracellular messenger but through precise regulation of the free calcium ion concentration in the cytosol, cells have been able to utilize polyanions such as phosphate. For review see Kardos *et al.* (1998).

ROC Oreffo: Do the authors have many data on the uni or bipotentiality of these cells?

Authors: Human pulp cells obtained by enzymatic digestion and cultured in specific inductive medium can commit toward an osteoblastic, adipogenic or an neuronal phenotype (Gronthos *et al.*, 2000; Gronthos *et al.*, 2002; Shi and Gronthos, 2003). In addition, preliminary results in our lab led us to suppose that in our model of human dental pulp cells a differentiation process towards chondrocytes can be induced by a chondrogenic medium. These results evidence the plasticity of dental pulp cells in culture.

Brigitte Alliot-Licht · Gilles Bluteau · David Magne ·
Serena Lopez-Cazaux · Blandine Lieubeau ·
Guy Daculsi · Jerome Guicheux

Dexamethasone stimulates differentiation of odontoblast-like cells in human dental pulp cultures

Received: 29 November 2004 / Accepted: 8 March 2005 / Published online: 30 June 2005
© Springer-Verlag 2005

Abstract Regenerative dental pulp strategies require the identification of precursors able to differentiate into odontoblast-like cells that secrete reparative dentin after injury. Pericytes have the ability to give rise to osteoblasts, chondrocytes, and adipocytes, a feature that has led to the suggestion that odontoblast-like cells could derive from these perivascular cells. In order to gain new insights into this hypothesis, we investigated the effects of dexamethasone (Dex), a synthetic glucocorticoid employed to induce osteogenic differentiation *in vitro*, in a previously reported model of human dental pulp cultures containing pericytes as identified by their expression of smooth muscle actin (SMA) and their specific ultrastructural morphology. Our data indicated that Dex (10^{-8} M) significantly inhibited cell proliferation and markedly reduced the proportion of SMA-positive cells. Conversely, Dex strongly stimulated alkaline phosphatase (ALP) activity and induced the expression of the transcript encoding the major odontoblastic marker, dentin sialophosphoprotein. Nevertheless, parathyroid hormone/parathyroid hormone-related peptide receptor, core-binding factor 1/OSF2, osteonectin, and lipoprotein lipase mRNA levels were not modified by Dex treatment. Dex also increased the proportion of cells expressing STRO-1, a marker of multipotential mesenchymal progenitor cells. These observations indicate that glucocorticoids regulate the commitment of progenitors derived from dental pulp cells to form odontoblast-like cells, while reducing the

proportion of SMA-positive cells. These results provide new perspectives in deciphering the cellular and molecular mechanisms leading to reparative dentinogenesis.

Keywords Dental pulp · Regeneration · Odontoblasts · Dexamethasone · Human

Introduction

During tooth formation, dental papilla stem cells located in close proximity to epithelial cells gradually differentiate into postmitotic odontoblasts that remain active for the life of the tooth and secrete primary and secondary dentin. Despite the absence of dentin turnover, it is well documented that, after dental injury and irreversible odontoblast damage, dental pulp is able to produce a reparative dentin matrix secreted by a second generation of odontoblast-like cells. In spite of considerable indirect evidence suggesting that odontoblast-like cells originate from progenitor/stem cells within the dental pulp (Tziafas et al. 2000), and despite the large number of *in vitro* studies conducted to improve our understanding of dental pulp cell physiology (Kasugai et al. 1993; Panagakos 1998; Shiba et al. 1998; Onishi et al. 1999; Couble et al. 2000; Gronthos et al. 2000), the mechanisms involved in the commitment of progenitor/stem cells to form an odontoblast-like phenotype remain poorly understood. In a previous study, we have observed that, in cultures of human pulp cells, mineralization spontaneously occurs in three-dimensional nodules. Moreover, in this model, we have described α -smooth muscle actin-positive (SMA+) cells with similar ultrastructural morphology to that of pericytes (Alliot-Licht et al. 2001). Pericytes have been demonstrated to differentiate into osteoblasts (Brighton et al. 1992; Diaz-Flores et al. 1992; Schor et al. 1995; Doherty et al. 1998), and other studies have suggested that pericytes may also have the potential to differentiate into chondrocytes, adipocytes, smooth muscle cells, macrophages, and fibroblasts (Doherty and Canfield 1999; Farrington-Rock et al. 2004). It is currently hypothesized that pericytes present in

This work was supported by grants from the "Institut Français pour la Recherche Odontologique" (B. Alliot-Licht), INSERM EM 9903 (J. Guicheux), and University of Nantes (G. Bluteau, B. Lieubeau). The monoclonal antibody STRO-1 developed by Beverly Torok-Storb was obtained from the Developmental Studies Hybridoma Bank developed under the auspices of the NICHD and maintained by the University of Iowa, Department of Biological Sciences, Iowa City, IA 52242, USA.

B. Alliot-Licht · G. Bluteau · D. Magne · S. Lopez-Cazaux ·
B. Lieubeau · G. Daculsi · J. Guicheux (✉)
INSERM EM9903, School of Dental Surgery,
1 Place Alexis Ricordeau,
44042 Cedex 1 Nantes, France
e-mail: jerome.guicheux@nantes.inserm.fr

dental pulp tissue may be able to differentiate into odontoblast-like cells involved in reparative dentinogenesis (Yamamura 1985; Fitzgerald et al. 1990; Shi and Gronthos 2003). Recently, a series of publications have shown that dental pulp tissue contains post-natal stem cells co-expressing STRO-1 (a cell surface antigen used to identify osteogenic precursors in bone marrow stromal cells) and CD146 (a pericyte marker) suggesting indirectly that odontoblast-like progenitors derive from a perivascular niche within dental pulp (Miura et al. 2003; Shi and Gronthos 2003).

The purpose of the present study has been to determine whether SMA⁺ cells can be affected by conditions that induce odontoblast-like differentiation. Indeed, we have aimed at demonstrating that pulp cells can be induced to express odontoblast-like markers when cultures are supplemented with dexamethasone (Dex). Although Dex is currently used to induce mineralization *in vitro* (Kasugai et al. 1993; Gronthos et al. 2000; Miura et al. 2003), little data are available regarding the specific effects of this glucocorticoid on dental pulp cells. To decipher the influence of Dex on odontoblast-like differentiation, we have analyzed the level of alkaline phosphatase (ALP) activity (Goseki et al. 1990; Onishi et al. 1999) and mRNA encoding for dentin sialophosphoprotein (DSP-PP). The DSP-PP gene, which encodes two dentin proteins, viz., dentin sialoprotein (DSP) and dentin phosphoprotein (DPP), is considered one of the major odontoblastic markers (D'Souza et al. 1997; Couble et al. 2000; Gronthos et al. 2000; Shi et al. 2001; Miura et al. 2003). Moreover, we have investigated the effects of Dex on the expression of markers of osteoblastic/odontoblastic differentiation, such as the parathyroid hormone/parathyroid hormone-related peptide (PTH/PTHrP) receptor (Yokose et al. 2000), osteonectin (ON), and core-binding factor $\alpha 1$ (Cbf $\alpha 1$ /osf2; Shi et al. 2001) and the expression of lipoprotein lipase (LPL), which is an adipocyte-specific marker (Gronthos et al. 2002). This study contributes to the knowledge of the inductive effects of Dex in dental pulp cultures and provides new insights into the behavior of SMA⁺ cells in an environment that promotes odontoblast-like differentiation.

Materials and methods

Cell isolation and culture

Human pulp cells were isolated and cultured as previously reported (Alliot-Licht et al. 2001). Briefly, human non-erupted third molars were extracted at the root-development stage for clinical reasons, under general anesthesia from healthy young people (14–25 years of age) who gave their informed consent. The teeth were immediately cracked opened, and the coronal pulp tissue was removed, minced into explants (<1 mm³), and placed in wells containing RPMI 1640 medium-glutamax (Life Technology, Cergy-Pontoise, France) supplemented with 100 IU/ml penicillin and 100 µg/ml streptomycin, 10 µg/ml amphotericin-B, and 10% fetal calf serum (FCS; all supplements

were from Life Technology) in a humidified atmosphere of 95% air and 5% CO₂ at 37°C. The standard medium was replaced every 2 days. After 1 month, and every 15 days, cells were collected by trypsinization (trypsin-EDTA; Life Technology) and seeded at a density of 20,000 cells/cm² in complete RPMI 1640, until the fourth passage. In order to provide the conditions for cellular differentiation and the induction of calcified matrix deposition as extensively reported in previous work (Kasugai et al. 1993; Gronthos et al. 1994; Kasperk et al. 1995; Mori et al. 1999; Stewart et al. 1999; Gronthos et al. 2000; Walsh et al. 2001; Pei et al. 2003), Dex (Sigma, La Verpillere, France) was added to the experimental cultures at a final concentration of 10⁻⁸ M; 0.1% ethanol (vehicle) was used as a control. The data presented herein were representative of reproducible results from 12 different donors.

As previously described, osteoblastic cell lines derived from human osteosarcoma, viz., MG-63 and SaOS-2, were used respectively as positive and negative controls for the expression of STRO-1 (Stewart et al. 1999). MG-63 were cultured in RPMI 1640 (Life Technology) supplemented with 100 IU/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin, 2 mM L-glutamine (Life Technology), and 5% FCS. SaOS-2 were maintained in DMEM (Life Technology) supplemented with 100 IU/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin, 2 mM L-glutamine, and 10% FCS.

Cell proliferation

The effect of Dex on proliferation of human dental pulp cells was monitored by quantifying DNA synthesis through the incorporation of [³H] thymidine and by cell counts. Cells were seeded at 30,000 cells per well (24-wells plates) in complete medium with Dex or its vehicle. Four hours prior to assay, half of the medium was replaced by fresh medium containing [³H] thymidine (1 µCi/ml; APB, Saclay, France). After several rinses with PBS, fixation for 15 min in 95% methanol, rinses in methanol, dehydration for 5 min at 37°C, and incubation for 1 h in 1 ml 0.1 N NaOH, radioactivity uptake was counted in a β -scintillation counter (Beckman, LS 6000SC). In order to provide an equivalent ratio of proliferation-stimulating factors, half of the medium was changed in all other wells. Cell counts were performed with a hemocytometer by using the trypan blue exclusion method. Results were expressed as total number of cells per well.

ALP activity

Cells were seeded in 6-well plates at a density of 10⁵ cells per well and cultured in complete medium containing Dex or vehicle. After 7 or 14 days in culture, the cell layers were rinsed with PBS, scraped into 1 ml buffer (10 mM TRIS-HCl, 5 mM MgSO₄, 0.1% Triton X-100, 0.1% NaNO₃), frozen (-20°C) and thawed three times, sonicated for 5 min to disrupt cell membranes, and centrifuged (4,000g) at 4°C for 15 min. ALP activity was determined by the hydrolysis

of *p*-nitrophenyl phosphate in 2-amino-2-methyl-1-propanol buffer (pH 10.4) at 37°C for 30 min. Absorbance at 405 nm was measured with a spectrophotometer (Bio-Rad 3550 microplate Reader). ALP activity was corrected for the total protein content (determined by the Bradford method with bovine serum albumin as a standard) and was expressed as nanomoles of paranitrophenol per milligram of total protein.

Total mRNA extraction

The expression of various dental-, bone-, and adipocyte-related transcripts was assessed by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). Total mRNA was extracted from human pulp cells seeded in 25-cm² flasks. After 14 days in culture, media (with or without Dex) were removed, and the cell layers were rinsed with RNase-free PBS and stored at -80°C. Total RNA was extracted by using the Trizol reagent (Life Technology) according to the manufacturer's instructions. Briefly, lysis of the cells in Trizol was followed by centrifugation at 12,000g, 4°C for 15 min in the presence of chloroform. The upper aqueous phase was collected, and the RNA was precipitated by the addition of isopropanol and centrifugation at 12,000g, 4°C for 10 min. RNA pellets were washed with cold 75% ethanol, dried, reconstituted with sterile water, and quantified by spectrometry.

RT-PCR technique

After DNase I digestion, RNA samples (2 µg) were reverse-transcribed by using AMV-RT and random hexamers (Promega, Charbonnières les bains, France) in a total volume of 30 µl. Template cDNAs (2.5 µl) were then amplified in a typical PCR: 2.5 µl 10× buffer (20 mM TRIS-HCl pH 8.4, 50 mM KCl; Life Technology), 1 µM respective primers, 200 µM dNTP, and 2.5 U *Taq* DNA polymerase (Life Technology). RNA samples that had not been reverse-transcribed were included to check the absence of

DNA contamination. Primer sequences for PTH/PTHrP receptor (Stewart et al. 1999), *Cbfa1/ost2* (Gronthos et al. 1999), ON (Gronthos et al. 1999), DSP-PP (Papagerakis et al. 2002), LPL (Gronthos et al. 2002), and D-glyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase (GAPDH; Bluteau et al. 1999) and annealing temperatures are detailed in Table 1. Amplifications were carried out in an Eppendorf master cycler (VWR, Brumath, France) under the following conditions: denaturation for 3 min at 95°C, followed by cycles of 20 s denaturation at 94°C, 20 s (or 45 s for LPL) annealing at the primer-specific temperature, and 10 s (or 60 s for LPL) elongation at 72°C. All PCR results showed amplification products obtained in the linear range of amplification.

Immunofluorescent labeling and flow cytometric analysis

α-SMA detection

On day 4 after being seeded on coverglasses, cells were washed twice with PBS, fixed in 4% paraformaldehyde solution for 1 h at 4°C, and washed for 20 min in washing buffer (PBS containing 3% bovine serum albumin). Cells were then incubated for 15 min in PBS containing 0.1% Triton X-100 to permeabilize the cell membranes, and for a further 30 min at 37°C with the monoclonal anti-SMA antibody (mouse IgG_{2a}; Sigma). After being rinsed, cells were incubated for 1 h at 37°C with fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated goat anti-mouse IgG antibodies (Sigma) and extensively washed. Negative controls were processed in the same way, except that the first antibody was replaced with an isotype-matched negative control antibody IgG_{2a} (Sigma). The coverglasses were then examined under a light microscope (Olympus BX60) equipped for fluorescence analysis.

Flow cytometric analysis of SMA expression was carried out on human pulp cells seeded at a density of 10⁶ cells in 75-cm² flasks and cultured in complete medium containing Dex (10⁻⁸ M) or its vehicle for 4 days. Cells were

Table 1 Primer sets and PCR conditions

Transcript name	PCR primer set (5'-3') amplicon	Annealing temperature	Size	Number of cycles
DSP-PP	Forward: GAGGATAAAGGACAACATGG Reverse: AAGAAGCATCTCCTCGGC	54°C	280 bp	38
PTH/PTHrP receptor	Forward: AGAAGAAGTACCTGTGGGGCTTCA Reverse: TTCCGGTACTGCTGCCGTGT	58°C	265 bp	35
<i>Cbfa1/ost2</i>	Forward: GTGGACGAGGCAAGAGTTTCA Reverse: TGGCAGGTAGGTGTGGTAGT	59°C	698 bp	35
ON	Forward: ATGAGGGCCTGGATCTTCTT Reverse: CTGCTTCTCAGTCAGAAGGT	58°C	576 bp	32
LPL	Forward: CTGTTGCCAGAGATGGAGGTT Reverse: TCATCGCTCAGGAGGTCCTT	59°C	393 bp	38
GAPDH	Forward: ATCACTGCCACCCAGAAGAC Reverse: ATGAGGTCCACCACCCTGGTT	57°C	443 bp	23

detached by using trypsin/EDTA, washed in PBS, and counted. Cells (5×10^5) were aliquoted and fixed with paraformaldehyde (4%) for 30 min. Cell membranes were permeabilized with Triton X-100 (0.025%) for 15 min and then rinsed twice with PBS. After being blocked with human AB serum (Blood Transfusion Center, University Hospital, Nantes, France) for 15 min, cells were incubated consecutively with the first and second antibodies used for immunocytochemistry (see above). Finally, cells were washed twice in PBS on ice and resuspended in 100 μ l paraformaldehyde solution (4%). Analyses of fluorescent cells based on the reading of 5,000 events were performed on a Becton Dickinson FACScalibur by using the Cell-Quest software program (BD Biosciences). The regions were set to the reactivity levels obtained with the isotype-matched negative control antibodies. Positivity was recorded as the percentage of labeled cells with fluorescence $\geq 99\%$ control cells.

STRO-1 detection

Immunofluorescent labeling and fluorescence-activated cell sorting (FACS) analysis were performed to determine the pattern of expression of the stromal precursor cell marker STRO-1 in sub-cultured dental pulp cells (3rd and 4th passages). MG-63 and SaOS-2 cells were used respectively as positive and negative controls. After 14 days for the human pulp cells and 4 days for the MG-63 and SaOS-2 cell lines, cells were harvested following treatment with trypsin-EDTA and counted. Cytocentrifuge slides were prepared at 500 rpm for 5 min in a cytospin with 20,000 cells per slide. Cells were air-dried overnight, fixed in acetone for 5 min, and stored at -20°C prior to staining. Staining was carried out in humidified chambers at room temperature. Cells were rehydrated in PBS supplemented with 2% FCS (washing buffer) for 5 min and incubated with supernatant containing anti-STRO-1 monoclonal antibody (DSHB, Iowa, USA) or an isotype-matched negative control antibody (mouse IgM; Sigma) for 1 h. After two washes, cells were incubated with a saturating FITC-conjugated goat anti-mouse IgM (μ -chain-specific; Sigma) for 30 min, washed once in PBS, and counterstained in PBS containing 0.002% ethidium bromide for 30 s. The counterstain was removed by rinsing

with tap water, and slides were mounted with 90% glycerol gelatin in PBS containing 2.5% DABCO (Sigma). Fluorescence staining was examined under a light microscope (Olympus BX60).

Flow cytometric (FACS) analysis of STRO-1 expression was assessed on dental pulp cells cultured for 14 days in complete medium containing Dex (10^{-8} M) or its vehicle. Cells were detached by using trypsin-EDTA, and 250,000 cells were incubated in 100 μ l STRO-1 supernatant (DSHB) or with an isotype-matched negative control antibody (mouse IgM; Sigma) for 1 h at 37°C , followed by two washes in PBS. Monoclonal antibody binding was detected with the same FITC-conjugated goat anti-mouse IgM (μ -chain-specific) antibody as that described above. Cells were then washed and fixed in paraformaldehyde (2%) before the fluorescence analysis on 5,000 events collected in a Becton Dickinson FACScalibur by using Cell-Quest software program (BD Biosciences, San Diego, Calif.). The region was set to the reactivity levels obtained with the isotype-matched negative control antibodies. Positivity was recorded as the percentage of labeled cells with fluorescence $\geq 98\%$ control cells.

Statistical analysis

Data are from one representative experiment out of three performed with similar results. Results are expressed as mean \pm SEM of triplicate determinations. Comparative studies of means were performed by using one-way analysis of variance (ANOVA) followed by a post-hoc test (Fisher's projected least significant difference) with statistical significance at $P < 0.05$.

Results

Human pulp cells in culture

After reaching confluence, cells cultured from explants of human dental pulp coalesced into multicellular foci or nodules (Fig. 1a). Cell retraction from other areas formed the distinct hill-and-valley-type of morphology (Fig. 1b). This cellular organization was previously described in cultures of microvascular pericytes (Proudfoot et al. 1998).

Fig. 1 Cell morphology of human dental pulp cells maintained in standard medium for 20 days. Standard phase-contrast photomicrographs illustrating the various cellular features in *primo* culture. **a** Cell retraction and multicellular nodules (*E* explant, *arrows* nodules). **b** Formation of hill-and-valley organization. Original magnification, $\times 40$

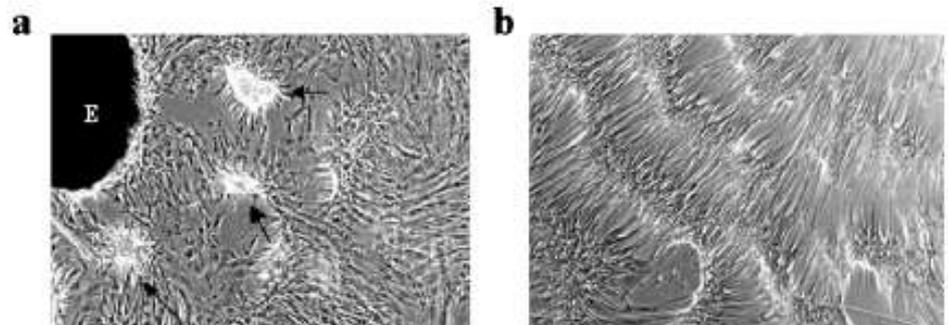
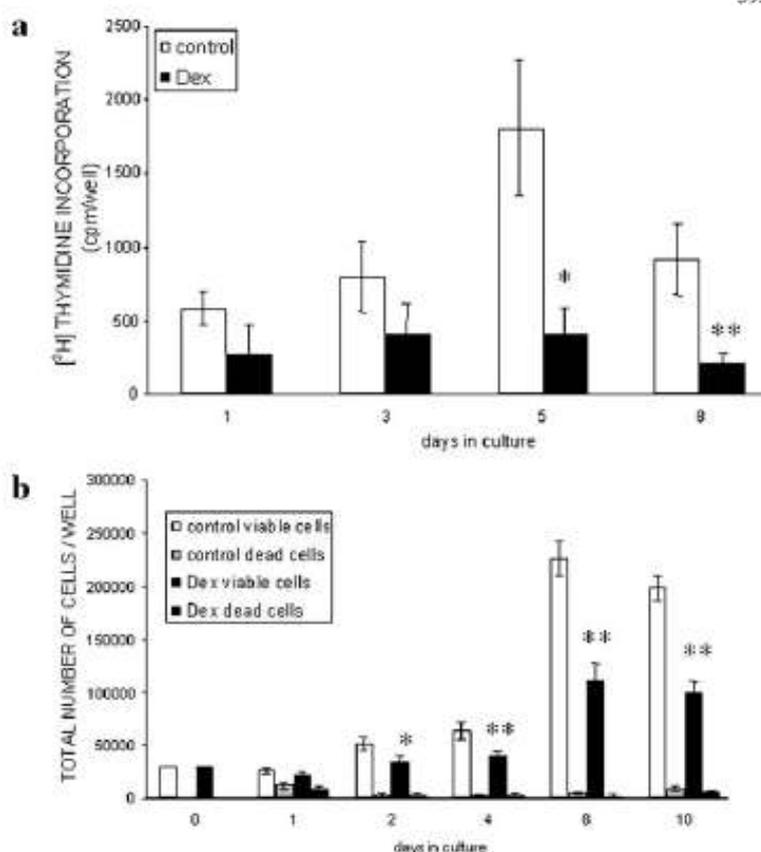


Fig. 2 Effects of Dex on human dental pulp cell proliferation. Cells were treated with Dex (10^{-8} M) or its vehicle (*control*) for the indicated times. **a** [3 H] Thymidine incorporation. **b** Cell counting. Results are expressed as mean \pm SEM of triplicate determination. Results of one representative experiment are shown (* $P < 0.05$, ** $P < 0.005$ compared with control).



Effects of Dex on cell proliferation

Dex induced a significant decrease in [3 H] thymidine incorporation of about four-fold on days 5 and 8 compared with control values ($P < 0.05$ at day 5, $P < 0.005$ at day 8; Fig. 2a). To confirm whether the decrease in [3 H] thymidine incorporation in Dex-treated cells was related to a decrease in the total number of cells, we counted both viable and dead cells (Fig. 2b). Dex significantly reduced the number of viable cells after 2, 4, 8, and 10 days in culture ($P = 0.0007$ at day 2, $P = 0.0001$ at days 4, 8, and 10). Moreover, no increase in the number of dead cells was detected after Dex treatment.

Effects of Dex on percentage of SMA+ cells

Immunofluorescent labeling revealed the presence of α -SMA+ cells in human dental pulp cultures as previously described (Alliot-Licht et al. 2001; Fig. 3a). To investigate the effects of Dex on this cell population, we assessed, by FACS, the number of SMA+ cells present after Dex treatment. Dex was found to induce a 2.6-fold decrease in the percentage of SMA+ cells compared with unstimulated cells (Fig. 3b).

Effects of Dex on odontoblast-like differentiation

To investigate the potential of human dental pulp cells undergoing odontoblast-like differentiation under Dex treatment, we assessed the ALP activity and the level of mRNA encoding DSP-PP of these cells. ALP activity of human dental pulp cells was markedly stimulated by Dex; a two-fold increase was observed after 7 days ($P = 0.0017$). This stimulation reached a maximum value after 14 days with a significant increase of about 350% ($P = 0.0001$; Fig. 4).

Moreover, we observed that Dex up-regulated the DSP-PP mRNA level, one of the major odontoblastic markers, when cells were treated with Dex for 14 days in culture (Fig. 5).

Effects of Dex on osteoblastic/odontoblastic and adipocyte markers

The effects of Dex on the steady-state level of mRNA encoding various osteoblastic/odontoblastic markers (PTH/PTHrP receptor, Cbfa1/ost2, ON) and one adipogenic marker (LPL) were analyzed (Fig. 5). Our results indicate that Dex did not increase the mRNA level for PTH/PTHrP receptor, Cbfa1/ost2, or ON and failed to induce LPL transcripts. As previously described (Gronthos et al. 1999), our

Fig. 3 α -Smooth muscle actin (SMA) expression in human dental pulp cells. **a** Cells were cultured for 4 days prior to SMA immunolabeling. Original magnification, $\times 400$. **b** FACS analysis of SMA⁺ cells in human dental pulp cultures after 4 days in the presence of 10^{-8} M Dex or its vehicle (No treatment). The areas defining the SMA⁺ cells on each FSC-H/FL1-H (forward scatter-height/fluorescence 1-height) dot plot were set on the dot plots obtained by staining untreated (vehicle) or treated cells, respectively, with the negative isotype-matched control antibody. The percentage of SMA⁺ cells is given. Results from one representative experiment are shown.

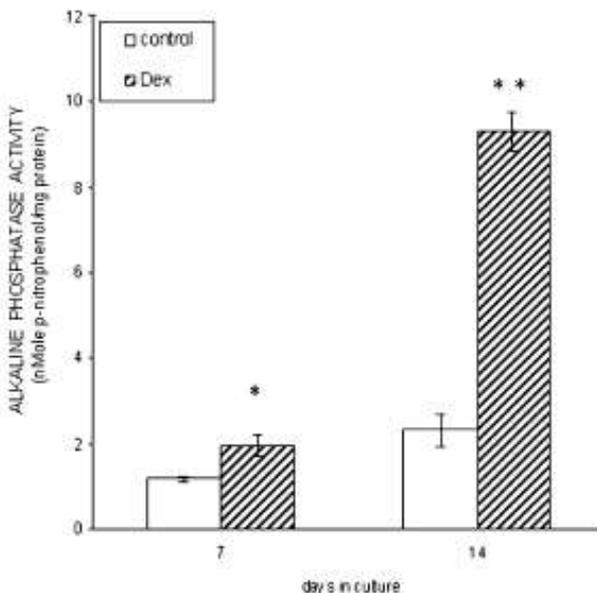
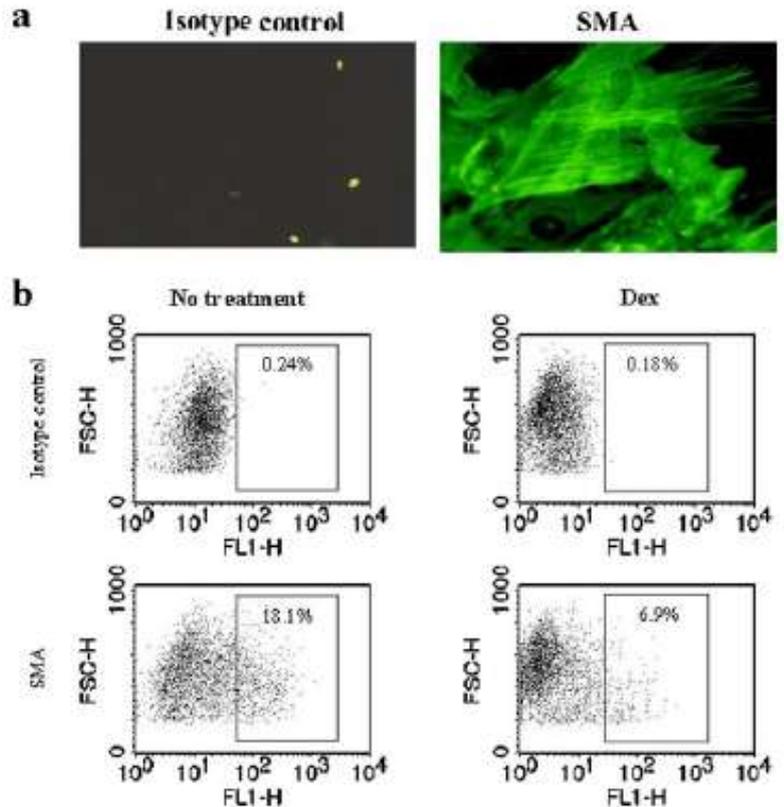


Fig. 4 Effects of Dex on alkaline phosphatase (ALP) activity of human dental pulp cells. Cells were cultured with Dex (10^{-8} M) or its vehicle (control) for the indicated times. Results are expressed as mean \pm SEM of triplicate determinations. Results of one representative experiment are shown (* $P < 0.005$, ** $P = 0.0001$ compared with control).

primer sets yielded three distinct splice variants in addition to the expected PCR product for Cbfa1/osf2.

Effects of Dex on STRO-1 expression in human pulp cultures

STRO-1 is a cell surface antigen used to identify osteogenic precursors in bone marrow stromal cells (Gronthos et al. 1994). After 14 days in culture, immunolabeling and FACS analyses were used to determine the expression pattern of STRO-1 in our human pulp culture model and to determine whether Dex could influence its expression. STRO-1⁺ cells were detected in human dental pulp cells (Fig. 6a, b). In addition, we observed STRO-1 immunoreactivity in cultures of MG-63 but not in SaOS-2 cultures (Fig. 6a) used as positive and negative controls, respectively, as previously reported (Stewart et al. 1999).

Although the proportion of STRO-1⁺ cells in the untreated cells (vehicle) was low (3.9%), Dex induced a 1.8-fold increase in the percentage of STRO-1⁺ cells (Fig. 6b).

Discussion

Because of the absence of dentin turnover after dental injury and irreversible odontoblast damage, the main goal of regenerative pulp treatment is to produce a second

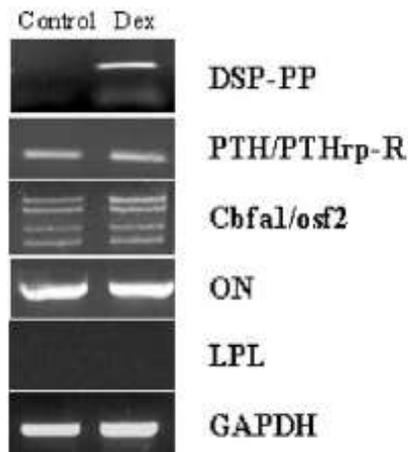


Fig. 5 Effect of Dex on the expression of dentin sialophosphoprotein (*DSP-PP*), parathyroid hormone/parathyroid hormone-related protein (*PTH/PTHrp*) receptor, osteonectin (*ON*), core-binding factor $\alpha 1/\text{osf}2$ (*Cbfa1/osf2*), and lipoprotein lipase (*LPL*) transcripts in human dental pulp cells (*GAPDH* control). Cells were cultured for 14 days with or without Dex, prior to RT-PCR analysis. Representative agarose gels are shown.

generation of odontoblast-like cells that will secrete reparative dentin (Tziafas et al. 2000). In spite of indirect evidence suggesting that odontoblast-like cells originate

from progenitor/stem cells that reside in the perivascular niche of dental pulp tissue (Shi and Gronthos 2003), the mechanisms involved in the commitment of these progenitors toward an odontoblast-like phenotype remain poorly understood (Mina and Braut 2004). In this context, we have scrutinized our human pulp culture model with respect to whether Dex, a synthetic glucocorticoid, can induce odontoblastic differentiation and affect putative competent progenitor cells derived from dental pulp tissue, with specific regard to SMA⁺ cells. Indeed, Dex has been widely used in culture to promote mineralization in bone marrow stromal cells (Bellows et al. 1990), pericytes (Brighton et al. 1992), and dental pulp cells (Kasugai et al. 1993; Gronthos et al. 2000; Miura et al. 2003). Our results demonstrate, for the first time, that Dex (acting either directly or indirectly) inhibits cellular proliferation, decreases the proportion of SMA⁺ cells, and stimulates the differentiation of human dental pulp cells into odontoblast-like cells.

This study has shown that thymidine incorporation and cell number decreases after Dex treatment of cultured human dental pulp cells. Conflicting results from bone cells have been reported regarding the effects of Dex on cellular proliferation (Beresford et al. 1994; Kim et al. 1999; Walsh et al. 2001). The effects of Dex on cellular growth have been suggested to be dependent on the stage of bone cell differentiation (Beresford et al. 1994; Walsh et al. 2001). Glucocorticoids might increase the proliferation of cells

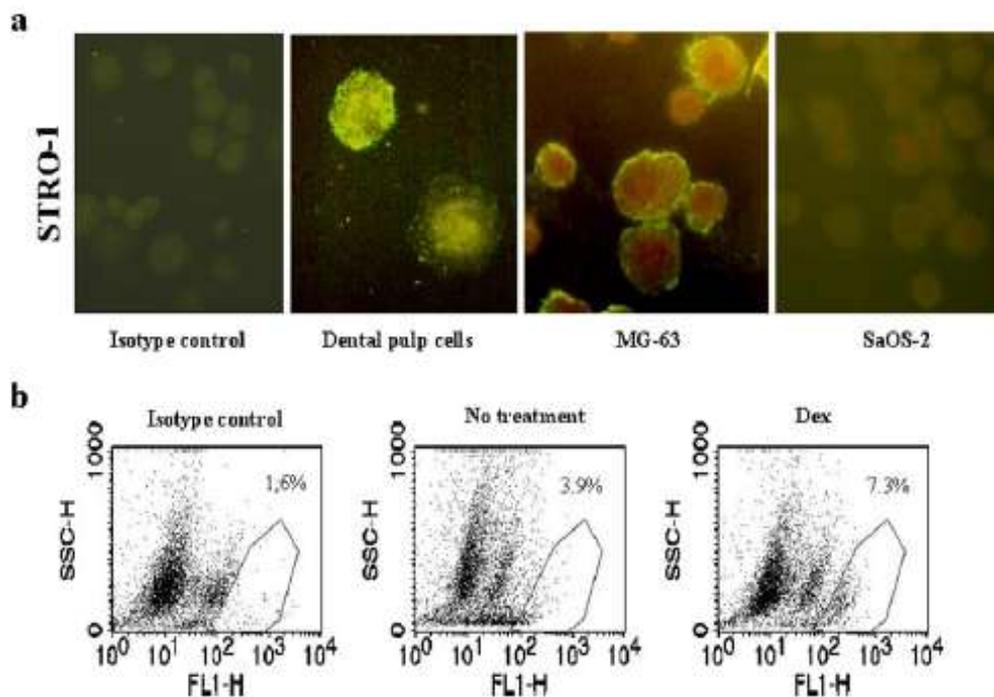


Fig. 6 STRO-1 expression by human dental pulp cells. **a** Binding of STRO-1 antigen to a cytospin preparation was detected by using FITC-conjugated secondary antibody on human dental pulp cells cultured for 14 days in standard medium and on human osteosarcoma cell lines MG-63 and SaOS-2 used as positive and negative controls, respectively. Original magnification, $\times 400$. **b** FACS analysis of STRO-1⁺ cells in human dental pulp cultures after 14 days in the

presence of Dex or its vehicle (*No treatment*). One area defining the STRO-1⁺ cells on each SSC-H/FL1-H (scatter side-height/fluorescence 1-height) dot plot was set on the dot plots obtained by staining untreated (not shown) or treated cells respectively with the negative isotype-matched control antibody. The percentage of STRO-1⁺ cells is given. Results from one representative experiment are shown.

that differentiate into osteoblasts, while inhibiting the proliferation of less differentiated progenitor cells (McCulloch and Tenenbaum 1986). In our study, because dental pulp cultures contain cells at various stages of differentiation, our data is in accordance with the effects of Dex on progenitor cells.

In dental pulp, SMA+ cells are usually postulated to give rise to odontoblast-like cells to form reparative dentin (Gronthos et al. 2000; Shi and Gronthos 2003). To address this issue further, we have studied whether SMA+ cells are Dex-dependent progenitors derived from human pulp. Our results provide evidence that Dex treatment decreases the proportion of SMA+ cells in culture. This can be explained by a decrease of SMA+ cell proliferation under Dex treatment. Moreover, because both the loss of SMA expression and the gain of osteogenic markers have been reported in mineralizing cultures of pericytes (Brighton et al. 1992) and aortic smooth muscle cells (Steitz et al. 2001), we suggest that the differentiating effect of Dex could occur concomitantly with the reduction in the expression of SMA. However, we cannot rule out the possibility that the decrease in the proportion of SMA+ cells is related to an indirect effect of Dex that induces changes in culture conditions, such as matrix deposition or growth factor synthesis. Indeed, these parameters are well-documented to influence the expression of SMA in culture (Shepro and Morel 1993; Verbeek et al. 1994; Schor et al. 1995; Doherty and Canfield 1999).

Because of numerous reports of a reciprocal and functionally coupled relationship between proliferation and differentiation, we next explored the effects of Dex on odontoblast-like markers. Our data showing a stimulatory effect of Dex on the level of ALP activity are in agreement with studies on other cell types, such as bone marrow stromal cells (McCulloch and Tenenbaum 1986; Beresford et al. 1994; Kasperk et al. 1995; Cheng et al. 1996; Hicok et al. 1998; Peter et al. 1998; Kim et al. 1999), rat dental papilla cells (Hao et al. 1997), cells isolated from mature human skeletal muscle tissue (Levy et al. 2001), and vascular smooth muscle cells (Mori et al. 1999). Our findings that Dex decreases cell proliferation and markedly increases ALP activity are therefore consistent with the concept that Dex treatment promotes cellular differentiation in culture.

To determine whether the enhancement of ALP activity, following treatment with glucocorticoids, is attributable to the stimulation of odontoblast-like differentiation, we next investigated the effect of Dex on DSP-PP expression. Although DSP-PP is expressed at a low level in bone (Qin et al. 2002), this gene is considered as a terminal phenotypic hallmark of mature odontoblasts (D'Souza et al. 1997; Couble et al. 2000). As expected, we have found evidence that Dex up-regulates DSP-PP mRNA expression. This result parallels those of Ritchie and co-workers (2004) who have recently found that Dex treatment results in an increase of DSP-PP mRNA in tooth germ cultures of postnatal rats. In light of this study and a recent report (Batouli et al. 2003) demonstrating the expression of DSP in cells secreting reparative dentin, one could propose that

Dex promotes the differentiation of at least one unidentified subpopulation of dental pulp cells toward an odontoblastic phenotype (Couble et al. 2000; Miura et al. 2003; Shi and Gronthos 2003).

In order to characterize those cells further, we next explored the effects of Dex on osteoblastic and/or odontoblastic differentiation markers. In an initial set of RT-PCR analyses, we found that human dental pulp cells expressed transcripts for the PTH/PTHrP receptor, osteonectin, and the transcription factor *Cbfa1/ostf2*. Our findings suggested that Dex did not modify the expression of these markers. However, with respect to the heterogeneity of human pulp cells, it was difficult to determine whether the majority of cells constitutively expressed these markers or whether this expression was restricted only to a subpopulation of cells that remained unidentified (Shi et al. 2001). Moreover, because Dex induction of early adipogenic markers was observed on bone marrow stromal stem cells (Hicok et al. 1998), we examined the expression of mRNA encoding LPL. In accordance with Gronthos and co-workers (Gronthos et al. 2002), we observed that dental pulp cultures did not express LPL following treatment with Dex. Both results suggest that Dex is unable to induce an adipocyte phenotype in these two models of dental pulp culture.

Finally, in order to evaluate the effect of Dex on progenitor/stem cell population, we analyzed the expression of STRO-1 in our dental pulp cultures. STRO-1 is a cell surface antigen extensively used to immunoselect osteoprogenitors derived from bone marrow stromal cells (Gronthos et al. 1994; Stewart et al. 1999; Walsh et al. 2000). It is expressed on precursors of various cell types, including marrow fibroblasts, osteoblasts, chondrocytes, adipocytes, and smooth muscle cells isolated from adult and fetal bone marrow (Simmons and Torok-Storb 1991; Stewart et al. 1999; Walsh et al. 2000). Moreover, STRO-1 expression has been recently described in frozen sections of human dental pulp tissue around blood vessel walls and is colocalized with CD146, a marker of pericytes (Miura et al. 2003; Shi and Gronthos 2003). We have found that Dex treatment results in a two-fold increase in the percentage of STRO-1+ cells, in agreement with the STRO-1 immunostaining of cultured bone marrow stromal cells demonstrating that Dex treatment regulates the proportion of STRO-1+ cells (Stewart et al. 1999; Walsh et al. 2000). However, although SMA+ cells express STRO-1 during their commitment to osteoblasts (Doherty et al. 1998; Doherty and Canfield 1999; Canfield et al. 2000), we do not have, at the moment, any evidence that our SMA+ cells differentiate into STRO-1+ cells following Dex treatment. Further studies of the expression of stromal cell markers, such as HOP-26/CD63, SB-10/CD166 (Bruder et al. 1997; Levy et al. 2001), pericyte-associated antigen (3G5), and CD146/MCU18 (a vascular antigen known to be expressed by endothelial and smooth muscle cells; Shi and Gronthos 2003) might refine our understanding of pulp cell differentiation toward odontoblast-like cells.

In conclusion, our data suggest that Dex treatment stimulates the commitment of pulp cells to odontoblast-like cells and provide new insights into the narrowing of the

dental pulp chamber observed in patients under long-term glucocorticoid treatments (Symons and Symons 1994). Finally, interest is growing in the identification of odontoblast-like precursors. Dex inductive effects could therefore be useful to help us to identify these precursors in human pulp.

Acknowledgements We gratefully acknowledge Dr. Catherine Pellat for assistance with the FACS analysis, Paul Pilet for helpful suggestions, Isabelle Brisson and Natalie Miller for critical reading of the manuscript, and the Dental Surgery Service, which provided teeth.

References

- Alliot-Licht B, Hurtrel D, Gregoire M (2001) Characterization of alpha-smooth muscle actin positive cells in mineralized human dental pulp cultures. *Arch Oral Biol* 46:221–228
- Batouli S, Miura M, Brahim J, Tsutsui TW, Fisher LW, Gronthos S, Robey PG, Shi S (2003) Comparison of stem-cell-mediated osteogenesis and dentinogenesis. *J Dent Res* 82:976–981
- Bellows CG, Heersche JN, Aubin JE (1990) Determination of the capacity for proliferation and differentiation of osteoprogenitor cells in the presence and absence of dexamethasone. *Dev Biol* 140:132–138
- Beresford JN, Joyner CJ, Devlin C, Triffitt JT (1994) The effects of dexamethasone and 1,25-dihydroxyvitamin D3 on osteogenic differentiation of human marrow stromal cells in vitro. *Arch Oral Biol* 39:941–947
- Bluteau G, Labourdette L, Ronziere M, Conrozier T, Mathieu P, Herbage D, Mallein-Gerin F (1999) Type X collagen in rabbit and human meniscus. *Osteoarthritis Cartilage* 7:498–501
- Brighton CT, Lorich DG, Kupcha R, Reilly TM, Jones AR, Woodbury RA II (1992) The pericyte as a possible osteoblast progenitor cell. *Clin Orthop Relat Res* 275:287–299
- Bruder SP, Horowitz MC, Mosca JD, Haynesworth SE (1997) Monoclonal antibodies reactive with human osteogenic cell surface antigens. *Bone* 21:225–235
- Canfield AE, Doherty MJ, Wood AC, Farrington C, Ashton B, Begum N, Harvey B, Poole A, Grant ME, Boot-Handford RP (2000) Role of pericytes in vascular calcification: a review. *Z Kardiol* 89:20–27
- Cheng SL, Zhang SF, Avioli LV (1996) Expression of bone matrix proteins during dexamethasone-induced mineralization of human bone marrow stromal cells. *J Cell Biochem* 61:182–193
- Couble ML, Farges JC, Bleicher F, Perrat-Mabillon B, Boudeulle M, Magloire H (2000) Odontoblast differentiation of human dental pulp cells in explant cultures. *Calcif Tissue Int* 66:129–138
- Diaz-Flores L, Gutierrez R, Lopez-Alonso A, Gonzalez R, Varela H (1992) Pericytes as a supplementary source of osteoblasts in periosteal osteogenesis. *Clin Orthop Relat Res* 275:280–286
- Doherty MJ, Canfield AE (1999) Gene expression during vascular pericyte differentiation. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 9:1–17
- Doherty MJ, Ashton BA, Walsh S, Beresford JN, Grant ME, Canfield AE (1998) Vascular pericytes express osteogenic potential in vitro and in vivo. *J Bone Miner Res* 13:828–838
- D'Souza RN, Cavender A, Sunavala G, Alvarez J, Ohshima T, Kulkarni AB, MacDougall M (1997) Gene expression patterns of murine dentin matrix protein 1 (Dmp1) and dentin sialophosphoprotein (DSPP) suggest distinct developmental functions in vivo. *J Bone Miner Res* 12:2040–2049
- Farrington-Rock C, Crofts NJ, Doherty MJ, Ashton BA, Griffin-Jones C, Canfield AE (2004) Chondrogenic and adipogenic potential of microvascular pericytes. *Circulation* 110:2226–2232
- Fitzgerald M, Chiego DJ Jr, Heys DR (1990) Autoradiographic analysis of odontoblast replacement following pulp exposure in primate teeth. *Arch Oral Biol* 35:707–715
- Goseki M, Oida S, Nifuji A, Sasaki S (1990) Properties of alkaline phosphatase of the human dental pulp. *J Dent Res* 69:909–912
- Gronthos S, Graves SE, Ohta S, Simmons PJ (1994) The STRO-1+ fraction of adult human bone marrow contains the osteogenic precursors. *Blood* 84:4164–4173
- Gronthos S, Zannettino AC, Graves SE, Ohta S, Hay SJ, Simmons PJ (1999) Differential cell surface expression of the STRO-1 and alkaline phosphatase antigens on discrete developmental stages in primary cultures of human bone cells. *J Bone Miner Res* 14:47–56
- Gronthos S, Mankani M, Brahim J, Robey PG, Shi S (2000) Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 97:13625–13630
- Gronthos S, Brahim J, Li W, Fisher LW, Cherman N, Boyde A, DenBesten P, Robey PG, Shi S (2002) Stem cell properties of human dental pulp stem cells. *J Dent Res* 81:531–535
- Hao J, Shi S, Niu Z, Xun Z, Yue L, Xiao M (1997) Mineralized nodule formation by human dental papilla cells in culture. *Eur J Oral Sci* 105:318–324
- Hickok KC, Thomas T, Gori F, Rickard DJ, Spelsberg TC, Riggs BL (1998) Development and characterization of conditionally immortalized osteoblast precursor cell lines from human bone marrow stroma. *J Bone Miner Res* 13:205–217
- Kasperk C, Schneider U, Sommer U, Niethard F, Ziegler R (1995) Differential effects of glucocorticoids on human osteoblastic cell metabolism in vitro. *Calcif Tissue Int* 57:120–126
- Kasugai S, Shibata S, Suzuki S, Susami T, Ogura H (1993) Characterization of a system of mineralized-tissue formation by rat dental pulp cells in culture. *Arch Oral Biol* 38:769–777
- Kim CH, Cheng SL, Kim GS (1999) Effects of dexamethasone on proliferation, activity, and cytokine secretion of normal human bone marrow stromal cells: possible mechanisms of glucocorticoid-induced bone loss. *J Endocrinol* 162:371–379
- Levy MM, Joyner CJ, Viridi AS, Reed A, Triffitt JT, Simpson AH, Kenwright J, Stein H, Francis MJ (2001) Osteoprogenitor cells of mature human skeletal muscle tissue: an in vitro study. *Bone* 29:317–322
- McCulloch CA, Tenenbaum HC (1986) Dexamethasone induces proliferation and terminal differentiation of osteogenic cells in tissue culture. *Anat Rec* 215:397–402
- Mina M, Braut A (2004) New insight into progenitor/stem cells in dental pulp using Col1a1-GFP transgenes. *Cells Tissues Organs* 176:120–133
- Miura M, Gronthos S, Zhao M, Lu B, Fisher LW, Robey PG, Shi S (2003) SHED: stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *Proc Natl Acad Sci USA* 100:5807–5812
- Mori K, Shioi A, Jono S, Nishizawa Y, Morii H (1999) Dexamethasone enhances in vitro vascular calcification by promoting osteoblastic differentiation of vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 19:2112–2118
- Onishi T, Kinoshita S, Shintani S, Sobue S, Ooshima T (1999) Stimulation of proliferation and differentiation of dog dental pulp cells in serum-free culture medium by insulin-like growth factor. *Arch Oral Biol* 44:361–371
- Panagakos FS (1998) Transformation and preliminary characterization of primary human pulp cells. *J Endod* 24:171–175
- Papagerakis P, Berdal A, Mesbah M, Peuchmaur M, Malaval L, Nydegger J, Simmer J, MacDougall M (2002) Investigation of osteocalcin, osteonectin, and dentin sialophosphoprotein in developing human teeth. *Bone* 30:377–385
- Pei W, Yoshimine Y, Heersche JN (2003) Identification of dexamethasone-dependent osteoprogenitors in cell populations derived from adult human female bone. *Calcif Tissue Int* 72:124–134
- Peter SJ, Liang CR, Kim DJ, Widmer MS, Mikos AG (1998) Osteoblastic phenotype of rat marrow stromal cells cultured in the presence of dexamethasone, beta-glycerolphosphate, and L-ascorbic acid. *J Cell Biochem* 71:55–62
- Proudfoot D, Skepper JN, Shanahan CM, Weissberg PL (1998) Calcification of human vascular cells in vitro is correlated with high levels of matrix Gla protein and low levels of osteopontin expression. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 18:379–388

- Qin C, Brunn JC, Cadena E, Ridall A, Tsujigiwa H, Nagatsuka H, Nagai N, Butler WT (2002) The expression of dentin sialoprotein gene in bone. *J Dent Res* 81:392-394
- Ritchie HH, Park H, Liu J, Bervoets TJ, Bronckers AL (2004) Effects of dexamethasone, vitamin A and vitamin D3 on DSP-PP mRNA expression in rat tooth organ culture. *Biochim Biophys Acta* 1679:263-271
- Schor AM, Canfield AE, Sutton AB, Arciniegas E, Allen TD (1995) Pericyte differentiation. *Clin Orthop Relat Res* 313:81-91
- Shepro D, Morel NM (1993) Pericyte physiology. *FASEB J* 7:1031-1038
- Shi S, Gronthos S (2003) Perivascular niche of postnatal mesenchymal stem cells in human bone marrow and dental pulp. *J Bone Miner Res* 18:696-704
- Shi S, Robey PG, Gronthos S (2001) Comparison of human dental pulp and bone marrow stromal stem cells by cDNA microarray analysis. *Bone* 29:532-539
- Shiba H, Fujita T, Doi N, Nakamura S, Nakanishi K, Takemoto T, Hino T, Noshiro M, Kawamoto T, Kurihara H, Kato Y (1998) Differential effects of various growth factors and cytokines on the syntheses of DNA, type I collagen, laminin, fibronectin, osteonectin/secreted protein, acidic and rich in cysteine (SPARC), and alkaline phosphatase by human pulp cells in culture. *J Cell Physiol* 174:194-205
- Simmons PJ, Torok-Storb B (1991) Identification of stromal cell precursors in human bone marrow by a novel monoclonal antibody, STRO-1. *Blood* 78:55-62
- Steitz SA, Speer MY, Curinga G, Yang HY, Haynes P, Aebersold R, Schinke T, Karsenty G, Giachelli CM (2001) Smooth muscle cell phenotypic transition associated with calcification: upregulation of Cbfa1 and downregulation of smooth muscle lineage markers. *Circ Res* 89:1147-1154
- Stewart K, Walsh S, Screen J, Jefferiss CM, Chainey J, Jordan GR, Beresford JN (1999) Further characterization of cells expressing STRO-1 in cultures of adult human bone marrow stromal cells. *J Bone Miner Res* 14:1345-1356
- Symons AL, Symons DJ (1994) Pulpal obliteration related to long-term glucocorticosteroid medication. *Spec Care Dent* 14:103-107
- Tziafas D, Smith AJ, Lesot H (2000) Designing new treatment strategies in vital pulp therapy. *J Dent* 28:77-92
- Verbeek MM, Otte-Holler I, Wesseling P, Ruiter DJ, Waal RM de (1994) Induction of alpha-smooth muscle actin expression in cultured human brain pericytes by transforming growth factor-beta 1. *Am J Pathol* 144:372-382
- Walsh S, Jefferiss C, Stewart K, Jordan GR, Screen J, Beresford JN (2000) Expression of the developmental markers STRO-1 and alkaline phosphatase in cultures of human marrow stromal cells: regulation by fibroblast growth factor (FGF)-2 and relationship to the expression of FGF receptors 1-4. *Bone* 27:185-195
- Walsh S, Jordan GR, Jefferiss C, Stewart K, Beresford JN (2001) High concentrations of dexamethasone suppress the proliferation but not the differentiation or further maturation of human osteoblast precursors in vitro: relevance to glucocorticoid-induced osteoporosis. *Rheumatology (Oxford)* 40:74-83
- Yamamura T (1985) Differentiation of pulpal cells and inductive influences of various matrices with reference to pulpal wound healing. *J Dent Res* 64:530-540
- Yokose S, Kadokura H, Tajima Y, Fujieda K, Katayama I, Matsuoka T, Katayama T (2000) Establishment and characterization of a culture system for enzymatically released rat dental pulp cells. *Calcif Tissue Int* 66:139-144

Revue / Review

Les cellules souches de la pulpe dentaire

Emmanuelle Renard^a, Séréna Lopez-Cazaux^{a,b}, Jérôme Guicheux^b, Pierre Weiss^{a,b,c,d},
Olivier Laboux^{a,c,d}, Brigitte Alliot-Licht^{a,b,c,*}

^a *CHU Nantes, pôle Odontologie, 1, place Alexis-Ricordeau, 44042 Nantes, France*

^b *Inserm, U791, laboratoire d'ingénierie ostéo-articulaire et dentaire, LJOAD, 1, place Alexis-Ricordeau, 44042 Nantes, France*

^c *Faculté de chirurgie dentaire, IFR 26, université de Nantes, 1, place Alexis-Ricordeau, 44042 Nantes, France*

^d *ERT 10-51, 1, place Alexis-Ricordeau, 44042 Nantes, France*

Reçu le 16 mars 2007 ; accepté après révision le 9 juillet 2007

Disponible sur Internet le 13 août 2007

Présenté par Jean Rosa

Résumé

Tout praticien rêve d'obtenir la régénération des organes détruits. Chez l'homme, la régénération de structures complexes est impossible. Néanmoins, le foie ou la moelle osseuse peuvent se régénérer grâce à la présence de cellules souches adultes. Les cellules souches possèdent deux propriétés primordiales : elles assurent leur autorenouvellement et elles ont la capacité de se différencier en plusieurs types cellulaires. À l'aide de marqueurs de surface spécifiques permettant d'identifier les cellules souches de la moelle osseuse, des cellules souches ont été observées dans la pulpe dentaire. L'origine, l'identification et la localisation de ces dernières restent encore mal connues, mais l'espoir que suscite actuellement la recherche sur les cellules souches permet de penser que l'étude des cellules souches d'origine dentaire aboutira peut-être à leur utilisation en thérapeutique. *Pour citer cet article : E. Renard et al., C. R. Biologies 330 (2007).*

© 2007 Académie des sciences. Publié par Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés.

Abstract

Stem cells of dental pulp. Any clinician dreams to obtain the regeneration of the destroyed organ for his patient. In the human being, the regeneration of complex structures is not possible, except the liver and the bone marrow, which can be regenerated because of the presence of adult stem cells in these tissues. The stem cells have two principal properties: they ensure their self-renewal and they have the ability to differentiate into several cellular types. Using specific markers allowing the identification of the stem cells in bone marrow, stem cells were observed in dental pulp tissues. Although the origin, the identification, and the localization of these stem cells of dental pulp remain under consideration, the optimism in research on stem cells permits to believe that the knowledge on dental stem cells will lead to their use in therapeutics. *To cite this article: E. Renard et al., C. R. Biologies 330 (2007).*

© 2007 Académie des sciences. Publié par Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés.

Mots-clés : Régénération ; Cellules souches ; Pulpe dentaire

Keywords : Regeneration ; Stem cells ; Dental pulp

* Auteure correspondante.

Adresse e-mail : brigitte.alliot-licht@univ-nantes.fr (B. Alliot-Licht).

Abridged English version

The study of the processes of cicatrisation in cold-blooded animals, in particular in the Amphibians, permits to understand the phenomena of regeneration of complex structures. Regeneration rather than repair is the process of cicatrisation that clinician dreams to obtain for his patients. Embryonic stem cells during the beginning of embryogenesis are the best candidates for regeneration, since one cell is able to reconstitute completely an entire body. Embryonic stem cells, derived from embryo after the seventh day, cannot reform an entire body, but they have the ability to contribute to the formation of all organs. However, embryonic stem cells raise many problems on ethical and scientific levels. Adult stem cells present in some tissues avoid these difficulties, but they are probably less powerful in their potential of regeneration. In fact, in the warm-blooded animals, including the human being, the regeneration of complex structures is impossible. Nevertheless, some organs, like liver or bone marrow, can be regenerated. This process of regeneration is possible because adult stem cells able to reform all of the components of the damaged organ persist in these tissues. Stem cells have two principal properties: they ensure their self-renewal maintaining, thus their cellular pool; moreover, they have the capacity to differentiate into several cellular types. In addition, specific markers of surface allow the identification of the stem cells. Interestingly, STRO-1, a specific marker of bone marrow stem cells, was observed in dental pulp tissues. With this marker, it is possible to isolate stem cells from dental pulp. These cells form colonies because of their self-renewal property. Moreover, these cells are able to differentiate into various cell types, like odontoblasts, but also osteoblasts, adipocytes, chondrocytes, and neuronal cells. These observations allow us to understand that dental pulp tissues contain adult stem cells able to regenerate the pulp dental complex, but also other tissues. However, the identification of stem cells of dental pulp remains unknown yet. The current statement is that these cells are localised around the blood vessels because they present a colocalisation with pericytes; however, other researchers have isolated and cultured dental pulp stem cells that do not express any markers of the pericytes. However that may be, the optimism in research on stem cells permits to believe that the knowledge on dental stem cells will lead to their use in therapeutics. These works should lead to the use of temporary teeth or third molars as an easily accessible source of adult stem cells for the regeneration of the dental tissues or other organs.

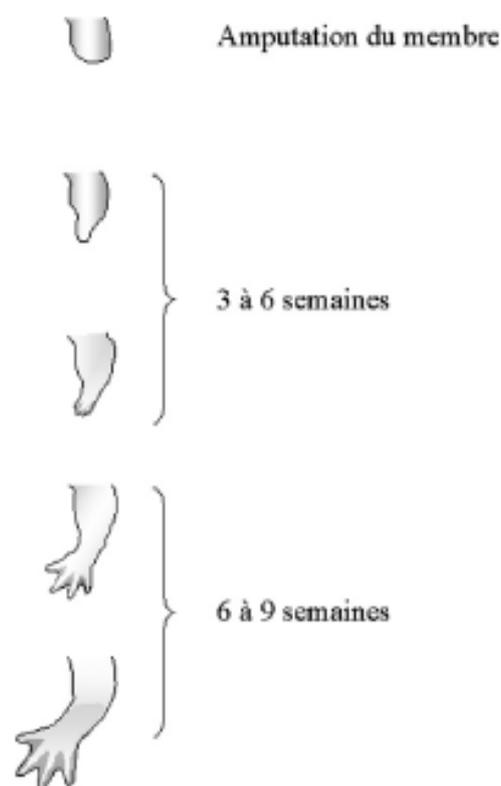


Fig. 1. Schéma montrant les différents stades de la régénération d'un membre chez un amphibien.

1. Introduction

Tout clinicien rêve d'obtenir un jour, pour ses patients, une régénération *ad integrum* des organes lésés.

L'étude des mécanismes de cicatrisation dans le monde animal nous permet d'observer, chez les animaux à sang froid, des phénomènes de régénération de structures complexes. Cette régénération existe chez les amphibiens, les reptiles et chez certains poissons. En effet, lorsqu'une salamandre perd un de ses membres, ou même une partie de sa tête ou de son cœur, cet amphibien de la famille des urodèles a la capacité de régénérer complètement l'organe perdu (Fig. 1). À la faveur de ces observations, un très grand nombre de laboratoires de recherche se sont intéressés à l'identification, à l'isolation de ces cellules souches et à leur utilisation en thérapeutique, espérant que ce type de régénération puisse un jour être possible chez l'homme. Devant la difficulté d'utilisation des cellules souches embryonnaires et sachant que les cellules embryonnaires ne pourront pas être des cellules du « soi » sans passer par le clonage, les recherches se sont orientées vers les cellules souches adultes. Actuellement, il a été montré que des cellules souches adultes mésenchymateuses peuvent être multipliées *in vitro* et régénérer, non seulement des tissus de type mésenchymateux, comme le tissu osseux, mais

aussi d'autres tissus, comme le tissu nerveux [1]. Au niveau dentaire, plusieurs équipes ont identifié des cellules souches adultes dans la pulpe dentaire et dans le ligament parodontal, permettant d'espérer pratiquer, un jour, des traitements biologiques et, ainsi, obtenir une régénération plutôt qu'une réparation de l'organe dentaire [2]. De plus, si les cellules souches adultes prouvent leur réelle utilité en thérapeutique régénératrice, il sera peut-être possible d'utiliser les cellules souches des dents temporaires ou des dents de sagesse pour régénérer du tissu osseux, du cartilage ou même du tissu nerveux. De nombreux chercheurs pensent que cet espoir est réellement fondé. En effet, aux États-Unis, des banques de cellules souches de pulpes dentaires existent déjà.

2. Mécanismes de régénération chez l'animal

Deux mécanismes de régénération sont possibles ; ils diffèrent par la persistance ou non de cellules souches. Après la perte d'un organe, les cellules souches situées à proximité de la lésion vont se différencier pour reformer tous les tissus nécessaires à la régénération : le tissu musculaire, le tissu osseux, le tissu vasculaire et le tissu nerveux. C'est ce qui se passe chez les hydres et les plathelminthes, mais aussi chez les mammifères, lors de la repousse saisonnière des bois du cerf.

La régénération peut se faire par un autre mécanisme, impliquant la capacité de dé-différenciation de certaines cellules qui siègent à proximité de la lésion. Ces cellules, en se dé-différenciant, prennent des caractéristiques de cellules souches et peuvent alors former un tissu différent de leur tissu d'origine. C'est le mécanisme qui préside à la néoformation des membres chez les amphibiens (Fig. 1).

3. Mécanismes de régénération chez l'homme

Il n'est pas possible pour l'homme de régénérer des structures complexes, comme le font les animaux à sang froid. Néanmoins, le foie, par exemple, possède la capacité de se régénérer lorsqu'il subi une lésion importante. De même, la moelle osseuse peut se régénérer après une aplasie dans les traitements des pathologies malignes des lignées sanguines.

D'où provient la capacité de régénération de ces tissus ? Persiste-t-il des cellules souches capables de différenciation et/ou possédons-nous des cellules capables de se dédifférencier et de se redifférencier, comme dans le modèle des salamandres ?

4. Les cellules souches embryonnaires

Les cellules embryonnaires humaines ont la capacité de s'autorenouveler et de se différencier, pour former tous les tissus qui constitueront l'organisme. Les cellules du blastocyste, jusqu'au septième jour de la vie embryonnaire, sont totipotentes. Après ce stade, elles perdent cette capacité de constituer un organisme entier. Néanmoins, les cellules souches embryonnaires, appelées alors « cellules souches embryonnaires germinales », conservent un potentiel de différenciation, qui leur permet de former tous les tissus de l'organisme, y compris ceux de la lignée germinale. Elles sont dites « pluripotentes » [3] (Figs. 2 et 3).

Ces cellules, prélevées sur les embryons humains issus de la fécondation *in vitro* ou par clonage, pourraient servir à l'avenir en thérapeutique pour régénérer des structures perdues après des traumatismes ou des cancers. Néanmoins, plusieurs obstacles se dressent aujourd'hui devant cette utilisation. En France, la législation

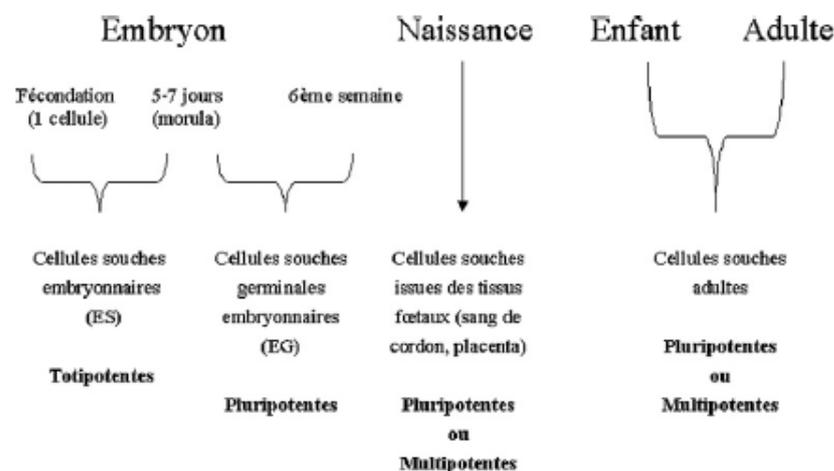


Fig. 2. Les différents types de cellules souches.

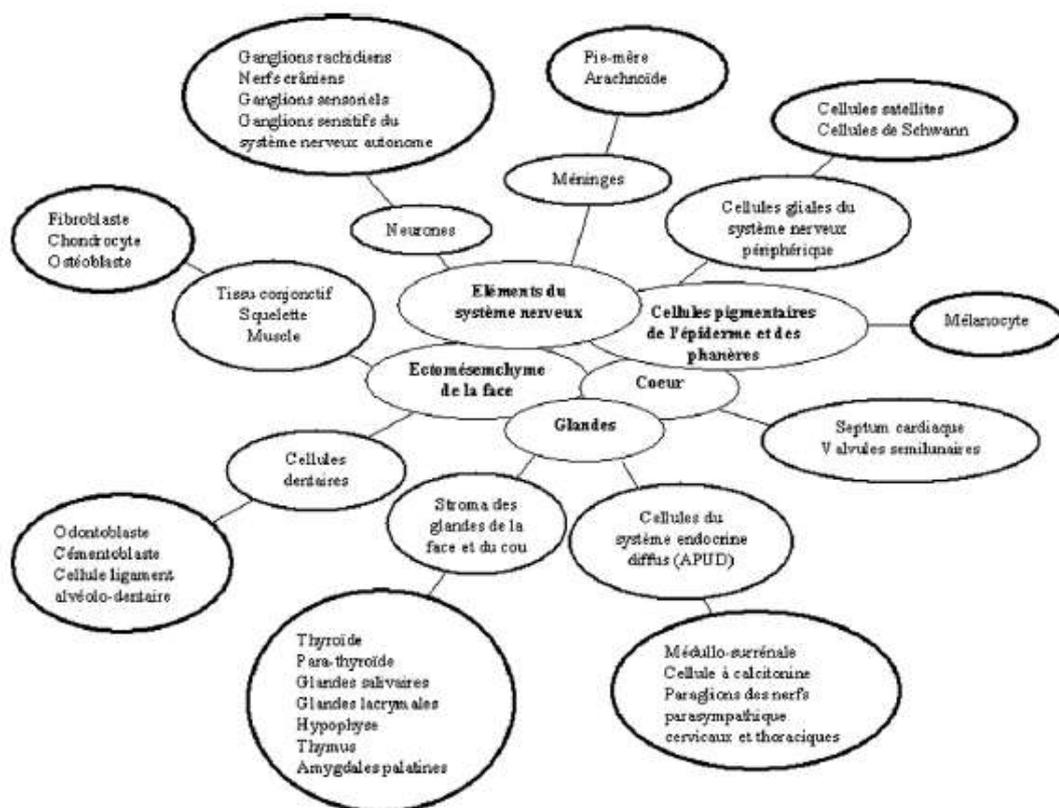


Fig. 3. Exemple de cellules souches embryonnaires pluripotentes : schéma récapitulatif résumant la capacité de différenciation des cellules des crêtes neurales.

et les lois bioéthiques relatives à la recherche sur l'embryon humain limitent considérablement la recherche sur ces cellules. Dans les pays anglo-saxons, notamment en Angleterre, le clonage de cellules humaines pour obtenir des cellules embryonnaires est admis, mais dans des conditions extrêmement contrôlées [4]. Le second problème concerne le risque de formation de tumeurs cancéreuses. Enfin, les risques de rejet des cellules par l'hôte sont importants. Ils sont de même nature que les réactions du receveur vis-à-vis du greffon (les cellules souches) [5].

C'est pour toutes ces raisons que les travaux de recherche se sont orientés vers l'étude des cellules souches adultes.

5. Les cellules souches adultes

Les cellules souches embryonnaires, au tout début de l'embryogenèse, sont les meilleures candidates pour la régénération, puisqu'elles sont capables de former le corps entier. Cependant, elles soulèvent de nombreux problèmes sur le plan éthique et scientifique. Les cellules souches adultes, présentes dans l'organisme, permettent d'éviter ces difficultés, mais sont probablement

moins performantes dans leur potentiel de régénération.

De nombreux tissus adultes contiennent des cellules souches capables d'assurer le renouvellement cellulaire. Ces cellules s'autorépliquent, permettant la conservation du *pool* cellulaire, et se différencient pour régénérer les tissus endommagés ou détruits par un traumatisme, une maladie, ou par le vieillissement. Presque tous les tissus de l'organisme sont concernés [6,7]. Le tissu dont on connaît le mieux le potentiel de régénération est probablement la moelle osseuse.

Les cellules souches de la moelle osseuse sont composées de deux types cellulaires :

- les cellules hématopoïétiques, qui donneront toutes les cellules de la lignée sanguine (les polynucléaires, les lymphocytes, les macrophages, les cellules dendritiques, les globules rouges et les plaquettes) ;
- les cellules mésenchymateuses (stromales), qui se situent dans le tissu de soutien des cellules hématopoïétiques. Ces cellules souches ont la capacité de se différencier et de former différents tissus de l'organisme, dont le tissu osseux, le tissu cartilagineux et le tissu graisseux [5,8].

L'étude des cellules souches de la moelle osseuse se fait par l'analyse, à l'aide d'anticorps, de marqueurs de surface. Ces marqueurs de surface sont hautement spécifiques de l'état de différenciation des cellules. On peut prendre pour exemple les marqueurs présents à la surface d'une cellule souche au cours de son processus de différenciation ostéoblastique. À l'aide d'anticorps spécifiques de protéines présentes sur les cellules non différenciées ou au tout début de leur différenciation ostéoblastique (par exemple STRO-1, CD31...), il est possible d'isoler les cellules souches mésenchymateuses de la moelle osseuse [9]. Ces cellules sont alors mises en culture, une ou deux par boîte (dilution limite) et, grâce à leur capacité d'autorenouvellement, elles forment des colonies de cellules identiques. Placées dans un milieu inducteur spécifique, ces cellules peuvent se différencier en un type cellulaire choisi. C'est pour ces capacités de différenciation en différents types de tissus que les cellules souches adultes sont dites « pluri- ou multipotentes » (Fig. 2).

6. Existe-t-il des cellules souches dans la pulpe dentaire ?

Les odontoblastes sont les cellules hautement différenciées responsables de la formation de la dentine. Les odontoblastes sont des cellules post-mitotiques, et cela implique qu'elles ne peuvent jamais s'autorenouveler par divisions cellulaires. Lors d'une agression dentino-pulpaire provoquant la dégénérescence des odontoblastes, les cellules de Höhl (situées dans la couche sous-odontoblastique) peuvent se différencier en odontoblastes, pour former de la dentine réactionnelle. Cependant, si l'agression est trop importante, lors d'une effraction pulpaire associée par exemple à un coiffage pulpaire, les cellules de Höhl disparaissent [10]. Dans ce cas, une première phase de néoangiogenèse induite par des facteurs de croissance (FGF-2 et VEGF) sécrétés par les fibroblastes pulpaire semble être une étape indispensable avant la sécrétion de dentine réparatrice [11]. Cette dentine réparatrice est sécrétée par des *odontoblast-like* issus de la différenciation des cellules progénitrices/cellules souches pulpaire [10,12–14]. Ce mécanisme de réparation pulpaire suggère donc qu'il existe des précurseurs/cellules souches dans la pulpe dentaire.

Afin de comprendre les mécanismes impliqués dans la formation de la dentine de réparation et d'identifier les précurseurs/cellules souches aptes à se différencier en *odontoblast-like*, la culture de cellules de la pulpe dentaire a largement été développée. En culture, les cellules de pulpe dentaire, obtenues par la tech-

nique d'explant ou par digestion enzymatique, acquièrent une morphologie qui s'apparente à celle des odontoblastes [15,16]. De plus, les protéines secrétées sont les mêmes que celles qui constituent la matrice dentinaire : la sialoprotéine dentinaire (DSP), la phosphoprotéine dentinaire (DPP) et la protéine de la matrice dentinaire (DMP1) [17–20]. Enfin, ces cellules expriment une enzyme impliquée dans le processus de minéralisation, la phosphatase alcaline, et sont capables d'induire une minéralisation similaire à celle observée dans la dentine [17]. Lorsque des cellules de pulpe dentaire cultivées pendant 15 jours sont transplantées en sous-cutané chez des animaux immunodéprimés, un complexe dentino-pulpaire se développe [18], confirmant la présence des précurseurs odontoblastiques dans les cultures de cellules de la pulpe dentaire. Ces études montrent la capacité des cellules de la pulpe dentaire à se différencier et former de nouveaux odontoblastes, qui vont sécréter une matrice dentinaire *in vitro* et *in vivo*.

7. Identification et localisation des cellules souches dans les tissus dentaires

L'identification, dans la pulpe dentaire, de marqueurs spécifiques des cellules souches confirme les hypothèses émises à partir des observations cliniques et histologiques. À l'aide d'anticorps monoclonaux, la présence de marqueurs spécifiques, tels que STRO-1 (marqueur des cellules souches de la moelle osseuse), dans la pulpe dentaire a été démontrée à la surface d'environ 6% des cellules de la pulpe dentaire en culture [21], sur des cellules situées à proximité des vaisseaux sanguins et au niveau des périneurions sur des coupes de tissus pulpaire humains [21].

À la périphérie des vaisseaux sanguins, il existe des cellules appelées myofibroblastes ou péricytes ou cellules de Rouget. Ces cellules répondent aux propriétés des cellules souches : autorenouvellement et différenciation [22,23]. Elles sont caractérisées par des éléments dans leur cytosquelette, tels que l'alpha actine du muscle lisse (α -SMA), et des marqueurs spécifiques, tels que CD146 et 3G5, que l'on retrouve dans les cultures de cellules de pulpe dentaire [19,21,24]. Une colocalisation du marqueur spécifique STRO-1 et de CD146 dans le tissu pulpaire fait suspecter fortement l'analogie entre les cellules souches pulpaire et les péricytes, et permettent de conclure que la niche de ces cellules souches est paravasculaire [21].

D'autres études consistent à isoler une population cellulaire dite *side population*, ou cellules SP, à l'aide d'un colorant fluorescent Hoechst 33342 lié à l'ADN [25]. Ces cellules ont été isolées à partir des

nombreux tissus contenant des cellules souches mésenchymateuses chez les mammifères [26]. Cette population, qui possède un grand potentiel d'autorenouvellement, a été caractérisée par de très nombreux marqueurs (récepteurs de la famille des SLAM, CD150, CD244, CD48), mais ne présente pas les marqueurs des péricytes (CD146 et α -SMA) [25].

L'ensemble de ces travaux confirme la présence de cellules souches adultes dans la pulpe dentaire [27]. L'hybridation *in situ* et la microscopie électronique ont permis de localiser certains marqueurs associés aux cellules SP (CD31 et *Bcrp1*) dans la région périvasculaire de la pulpe dentaire [25]. Cependant, l'absence des marqueurs des péricytes sur les cellules SP suggère que la population de cellules souche de la pulpe dentaire isolées par Iohara [25] ne seraient pas les péricytes. Par ailleurs, cette population SP pourrait constituer une niche secondaire de cellules progénitrices [27].

8. Capacités de différenciation des cellules de la pulpe dentaire

Un nombre grandissant de travaux récents montre que, lorsqu'elles sont placées dans des milieux spécifiques, les cellules souches de la pulpe dentaire peuvent se différencier en d'autres types cellulaires que les odontoblastes et donc possèdent, outre leur capacité d'autorenouvellement, la capacité d'acquies d'autres voies de différenciation.

Cette différenciation peut être ostéoblastique : les cellules pulpaire (SP ou STRO-1) mises en culture dans des milieux inducteurs spécifiques de la différenciation ostéoblastique, notamment les facteurs de croissance de la famille des BMP (protéines de la morphogénèse osseuse), ont la capacité de se différencier en ostéoblastes [25]. En 2004, Mina et Braut ont observé la capacité de différenciation des cellules de la pulpe dentaire d'une souris transgénique. Ils ont pu démontrer clairement que la pulpe dentaire contient des progéniteurs d'odontoblastes, mais aussi d'ostéoblastes [28]. Les cellules pulpaire seraient une source potentielle pour la réparation osseuse car, après un temps de culture ostéoinductive, ces cellules transplantées *in vivo* ont la capacité de se former du tissu osseux [29].

La différenciation peut être neuronale : des cellules de pulpe de dents temporaires transplantées dans le cerveau d'une souris immunodéprimée se sont différenciées et ont exprimé à leur surface certains marqueurs spécifiques des cellules neuronales [30]. Ces travaux ont été confirmés par la capacité de différenciation neurogénique des cellules SP de la pulpe dentaire [25].

La différenciation peut aussi être adipogénique : il a été montré l'agglutination de gouttelettes lipidiques après cinq semaines de culture des cellules souches pulpaire dans un milieu de culture contenant un cocktail adipogénique [31]. La capacité de différenciation adipocytaire est confirmée par la présence de PPAR γ 2 (*peroxysome proliferator-activated receptor γ 2*) et de lipoprotéine lipase (LPL) [31]. De même, les cellules SP de la pulpe dentaire présentent une capacité de différenciation adipogénique [25].

Il peut s'agir enfin de différenciation chondrogénique : la culture de cellules de pulpe dentaire dans un milieu contenant de l'acide ascorbique-2 phosphate et du TGF- β , avec ou sans dexaméthasone, met en évidence la présence de glycosaminoglycane sulfatés présents en grande quantité dans le cartilage (aggrecan) et du collagène II, impliquant la différenciation en chondrocytes des cellules de la pulpe dentaire [32]. Les travaux de Iohara et al., en 2006 [25], ont aussi montré la capacité de différenciation chondrogénique des cellules SP de la pulpe.

L'ensemble de ces résultats démontre, de façon formelle, la présence de cellules souches dans la pulpe dentaire. Ces cellules peuvent être isolées à l'aide de différents marqueurs de surface, elles peuvent être amplifiées en culture et induites, soit en odontoblastes, soit en d'autres types cellulaires.

À la suite de la découverte des cellules souches dans la pulpe dentaire, Seo et al. (2004) ont mis en évidence la présence de cellules souches dans le desmodonte [13]. Ces cellules peuvent, si elles sont transplantées *in vivo*, produire un nouveau ciment et une nouvelle structure ligamentaire. Les perspectives de l'utilisation de ces cellules du ligament dans la régénération parodontale après une atteinte de l'os alvéolaire et des structures du parodonte sont fortement envisagées aujourd'hui.

9. Utilisation des cellules souches d'origine dentaire

Le très grand nombre d'articles publiés au cours des années 2006 et 2007 témoignent de l'intérêt porté aux cellules souches issues des dents et à leur utilisation potentielle en odontologie [2,4,7,15,33–40]. Différentes pistes d'applications cliniques sont à ce jour évoquées : la régénération pulpaire, l'endodontie et, ce qui est plus ambitieux, la régénération complète de l'organe dentaire.

De plus en plus d'équipes de recherche s'intéressent à l'utilisation des cellules souches pulpaire pour régénérer le complexe pulpo-dentinaire. Lors d'une atteinte carieuse ou traumatique atteignant la pulpe dentaire, les

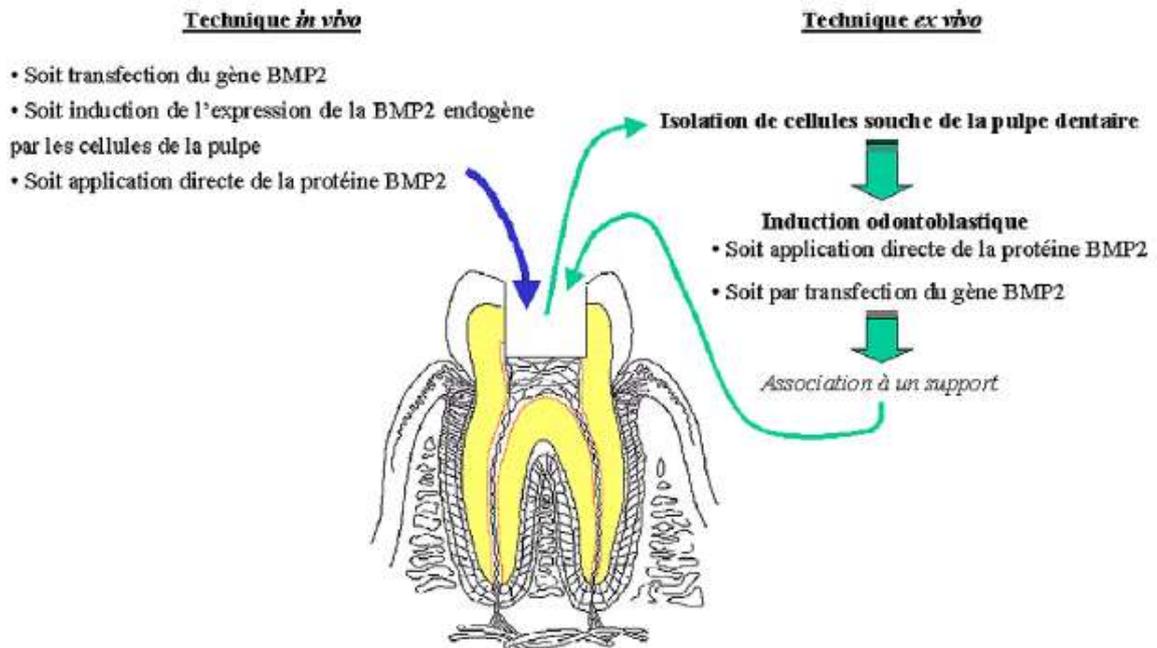


Fig. 4. Application clinique in vivo et ex-vivo du potentiel de régénération des cellules souches de la pulpe dentaire.

cellules souches de la pulpe seraient induites pour permettre leur différenciation odontoblastique et la création d'une nouvelle structure dentino-pulpaire comprenant de la dentine et de la pulpe vascularisée et innervée [3, 41–43]. Pour induire la différenciation des cellules pulpaires en odontoblastes, un facteur de croissance, la BMP2 (*Bone Morphogenetic Protein 2*) a été utilisé, soit directement, soit par thérapie génique.

Il existe deux méthodes principales pour induire la formation d'un complexe pulpo dentinaire : les méthodes in vivo et ex vivo (Fig. 4).

Dans la méthode in vivo, le potentiel de cicatrisation de la pulpe dentaire est induit par l'application directe sur la pulpe lésée, soit de la protéine BMP2, soit du gène de la BMP2, provoquant la production de dentine. Il est aussi possible de faire produire par les cellules pulpaires la BMP2 endogène [25,27,44].

Dans la technique ex vivo, les cellules souches de la pulpe dentaire sont tout d'abord isolées, puis induites en différenciation odontoblastique, soit directement par la BMP2, soit par transfection du gène de la BMP2. Le tout est ensuite associé à un support et réintroduit au niveau de la pulpe exposée [25,45].

Certains auteurs [46] ont mis en évidence l'intérêt de l'utilisation d'autres facteurs de croissance afin d'induire la formation de dentine réparatrice ou la minéralisation totale de la pulpe. Ces facteurs de croissance peuvent être le TGF β (*Transforming Growth Factor*), l'IGF (*Insulin Growth Factor*) ou la protéine BSP (*Bone Sialo Protein*). Ils provoquent le recrutement de cellules

souches, lorsqu'ils sont placés au contact de la pulpe exposée. Une fois recrutées, les cellules entrent dans le stade de différenciation, et produisent alors une matrice qui minéralise ultérieurement. Actuellement, sont menées des recherches sur la capacité de régénération induite par l'amélogénine sur un clone de cellules souche issues de pulpe dentaire de souris transgéniques [4].

Une autre utilisation des cellules souches évoquée en pratique clinique dentaire est la régénération complète de l'organe dentaire, avec son ligament alvéolodentaire. Chez le rat, Duailibi et al. (2004) ont montré que les cellules du germe dentaire sont capables, en culture, de se réorganiser et de former une « mini-dent » [47]. Dans cette étude, l'objectif est de développer des rudiments de germes dentaires qui, une fois transplantés dans l'os alvéolaire, pourraient entamer un processus de développement et d'éruption pour former une dent. L'équipe de Pamela Robey propose d'appliquer les techniques de développement des greffes osseuses vascularisées, pour créer une dent viable. Cela suppose d'utiliser un moule de la couronne composé d'émail et rempli de cellules souches de pulpe dentaire et de HA/TCP (mélange d'hydroxyapatite et de phosphate tricalcique); le tout est inséré dans une zone très vascularisée, par exemple un site musculaire. Une fois la croissance terminée, la structure dentino-pulpaire peut être transférée dans la cavité buccale. Cette auteure propose d'utiliser des cellules du ligament alvéolodentaire pour reformer un cément et un nouveau ligament [48]. À l'heure actuelle, il est prématuré de penser proposer à nos patients la ré-

génération de leur dents absentes ; néanmoins, tous les espoirs sont permis : Tim Mitsiadis en 2003 [49] n'a-t-il pas déjà créé une chimère de poule avec des bourgeons dentaires ?

D'un point de vue plus général, un nombre croissant de laboratoires travaille sur l'utilisation possible de la pulpe dentaire ou du ligament comme source de cellules souches adultes pour régénérer du tissu osseux, du cartilage, ou même du tissu nerveux. Au Texas, par exemple, une société a ouvert une « banque » de cellules souches provenant de la pulpe de dents temporaires, dans l'espoir qu'elles puissent servir un jour au traitement de maladies ou d'atteintes paralysantes de la moelle épinière. Néanmoins, il reste très prématuré d'espérer utiliser les cellules souches d'origine dentaire pour la thérapeutique des troubles neurologiques. Ces concepts, il y a peu de temps surréalistes, sont aujourd'hui de plus en plus pris au sérieux. Cela sera sûrement possible un jour ; la principale question est de savoir quand cela sera réalisable sans danger pour les sites d'implantation, sans risque de constitution d'une structure aberrante et de développement malin.

10. Conclusion

L'identification des cellules souches constitue une innovation majeure de la recherche en biologie. On en a pour preuve le nombre grandissant d'articles qui traitent des avancées de la recherche dans ce domaine depuis 2003. Il est fort probable, aujourd'hui, que nous soyons à l'aube de l'utilisation en clinique des cellules souches, grâce aux techniques d'ingénierie tissulaire. Cette technique nécessite un support approprié, qui permet l'induction des cellules souches dans la voie de différenciation choisie sous l'effet de facteurs d'induction adéquats.

La découverte de cellules souches dans la pulpe dentaire a permis de mieux comprendre la régénération dentinaire après coiffage pulpaire. Mais, de façon plus surprenante, il a été montré que, placées dans un milieu adéquat, les cellules souches pulpaires sont capables de se différencier en chondrocytes, adipocytes, ostéoblastes, cellules nerveuses et pourraient donc être utilisées dans de nombreux domaines qui dépassent le cadre de la dentisterie. Enfin, l'ingénierie tissulaire ouvre des perspectives sur la régénération complète de l'organe dentaire. Cependant, de nombreux travaux restent à réaliser avant de passer du rêve à la réalité.

Le projet présente un tel enjeu que certains chercheurs, et non des moindres, ont déjà conservé les dents temporaires de leurs enfants à des fins d'utilisation future !

Références

- [1] M.F. Pittenger, A.M. Mackay, S.C. Beck, R.K. Jaiswal, R. Douglas, J.D. Mosca, M.A. Moorman, D.W. Simonetti, S. Craig, D.R. Marshak, Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells, *Science* 284 (1999) 143–147.
- [2] A.J. Sloan, A.J. Smith, Stem cells and the dental pulp: potential roles in dentine regeneration and repair, *Oral Dis.* 13 (2007) 151–157.
- [3] P.H. Krebsbach, P.G. Robey, Dental and skeletal stem cells: potential cellular therapeutics for craniofacial regeneration, *J. Dent. Educ.* 66 (2002) 766–773.
- [4] S. Lacerda-Pinheiro, N. Jegat, D. Septier, F. Priam, M. Bonnefoix, J. Bitard, O. Kellermann, K. Tompkins, A. Veis, M. Goldberg, A. Poliard, Early in vivo and in vitro effects of amelogenin gene splice products on pulp cells, *Eur. J. Oral. Sci.* 114 (Suppl. 1) (2006) 232–238; discussion 254–256, 381–382.
- [5] D. Zipori, Mesenchymal stem cells: harnessing cell plasticity to tissue and organ repair, *Blood Cells Mol. Dis.* 33 (2004) 211–215.
- [6] F.P. Barry, Biology and clinical applications of mesenchymal stem cells, *Birth Defects Res. C Embryo Today* 69 (2003) 250–256.
- [7] O. Trubiani, G. Orsini, S. Caputi, A. Piatelli, Adult mesenchymal stem cells in dental research: a new approach for tissue engineering, *Int. J. Immunopathol. Pharmacol.* 19 (2006) 451–460.
- [8] P. Bianco, M. Riminucci, S. Gronthos, P.G. Robey, Bone marrow stromal stem cells: nature, biology, and potential applications, *Stem Cells* 19 (2001) 180–192.
- [9] S. Gronthos, A.C. Zannettino, S.E. Graves, S. Ohta, S.J. Hay, P.J. Simmons, Differential cell surface expression of the STRO-1 and alkaline phosphatase antigens on discrete developmental stages in primary cultures of human bone cells, *J. Bone Miner. Res.* 14 (1999) 47–56.
- [10] D. Tziafas, A.J. Smith, H. Lesot, Designing new treatment strategies in vital pulp therapy, *J. Dent.* 28 (2000) 77–92.
- [11] L. Tran-Hung, S. Mathieu, I. About, Role of human pulp fibroblasts in angiogenesis, *J. Dent. Res.* 85 (2006) 819–823.
- [12] T.A. Mitsiadis, C. Rahiotis, Parallels between tooth development and repair: conserved molecular mechanisms following carious and dental injury, *J. Dent. Res.* 83 (2004) 896–902.
- [13] B.M. Seo, M. Miura, S. Gronthos, P.M. Bartold, S. Batouli, J. Brahimi, M. Young, P.G. Robey, C.Y. Wang, S. Shi, Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament, *Lancet* 364 (2004) 149–155.
- [14] D. Tziafas, G. Belibasakis, A. Veis, S. Papadimitriou, Dentin regeneration in vital pulp therapy: design principles, *Adv. Dent. Res.* 15 (2001) 96–100.
- [15] G.T. Huang, K. Shagramanova, S.W. Chan, Formation of odontoblast-like cells from cultured human dental pulp cells on dentin in vitro, *J. Endod.* 32 (2006) 1066–1073.
- [16] G.T. Huang, W. Sonoyama, J. Chen, S.H. Park, In vitro characterization of human dental pulp cells: various isolation methods and culturing environments, *Cell Tissue Res.* 324 (2006) 225–236.
- [17] M.L. Couble, J.C. Farges, F. Bleicher, B. Perrat-Mabillon, M. Boudeulle, H. Magloire, Odontoblast differentiation of human dental pulp cells in explant cultures, *Calcif. Tissue Int.* 66 (2000) 129–138.

- [18] S. Gronthos, M. Mankani, J. Brahimi, P.G. Robey, S. Shi, Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo, *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 97 (2000) 13625–13630.
- [19] B. Alliot-Licht, D. Hurtrel, M. Grégoire, Characterization of alpha-smooth muscle actin positive cells in mineralized human dental pulp cultures, *Arch. Oral Biol.* 46 (2001) 221–228.
- [20] S. Lopez-Cazaux, G. Bluteau, D. Magne, B. Lieubeau, J. Guicheux, B. Alliot-Licht, Culture medium modulates the behaviour of human dental pulp-derived cells: technical note, *Eur. Cell Mater.* 11 (2006) 35–42; discussion 42.
- [21] S. Shi, S. Gronthos, Perivascular niche of postnatal mesenchymal stem cells in human bone marrow and dental pulp, *J. Bone Miner. Res.* 18 (2003) 696–704.
- [22] M.J. Doherty, B.A. Ashton, S. Walsh, J.N. Beresford, M.E. Grant, A.E. Canfield, Vascular pericytes express osteogenic potential in vitro and in vivo, *J. Bone Miner. Res.* 13 (1998) 828–838.
- [23] C. Farrington-Rock, N.J. Crofts, M.J. Doherty, B.A. Ashton, C. Griffin-Jones, A.E. Canfield, Chondrogenic and adipogenic potential of microvascular pericytes, *Circulation* 110 (2004) 2226–2232.
- [24] B. Alliot-Licht, G. Bluteau, D. Magne, S. Lopez-Cazaux, B. Lieubeau, G. Daculsi, J. Guicheux, Dexamethasone stimulates differentiation of odontoblast-like cells in human dental pulp cultures, *Cell Tissue Res.* 321 (2005) 391–400.
- [25] K. Iohara, L. Zheng, M. Ito, A. Tomokiyo, K. Matsushita, M. Nakashima, Side population cells isolated from porcine dental pulp tissue with self-renewal and multipotency for dentinogenesis, chondrogenesis, adipogenesis, and neurogenesis, *Stem Cells* 24 (2006) 2493–2503.
- [26] A. Asakura, M.A. Rudnicki, Side population cells from diverse adult tissues are capable of in vitro hematopoietic differentiation, *Exp. Hematol.* 30 (2002) 1339–1345.
- [27] M. Nakashima, K. Iohara, L. Zheng, Gene therapy for dentin regeneration with bone morphogenetic proteins, *Curr. Gene Ther.* 6 (2006) 551–560.
- [28] M. Mina, A. Braut, New insight into progenitor/stem cells in dental pulp using Col1a1-GFP transgenes, *Cells Tissues Organs* 176 (2004) 120–133.
- [29] G. Papaccio, A. Graziano, R. d'Aquino, M.F. Graziano, G. Pirozzi, D. Menditti, A. De Rosa, F. Carinci, G. Laino, Long-term cryopreservation of dental pulp stem cells (SBP-DPSCs) and their differentiated osteoblasts: a cell source for tissue repair, *J. Cell. Physiol.* 208 (2006) 319–325.
- [30] M. Miura, S. Gronthos, M. Zhao, B. Lu, L.W. Fisher, P.G. Robey, S. Shi, SHED: Stem cells from human exfoliated deciduous teeth, *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 100 (2003) 5807–5812.
- [31] S. Gronthos, J. Brahimi, W. Li, L.W. Fisher, N. Cherman, A. Boyde, P. DenBesten, P.G. Robey, S. Shi, Stem cell properties of human dental pulp stem cells, *J. Dent. Res.* 81 (2002) 531–535.
- [32] K. Yamashita, J. Dennis, D.P. Lennon, H. Morimoto, S. Kitamura, I.A. Caplan, Dental pulp cells with multi-potential for differentiation to odontoblasts and chondroblasts, *J. Hard Tissue Biol.* 12 (2003) 49–55.
- [33] W. Zhang, X. Frank Walboomers, T.H. van Kuppevelt, W.F. Daamen, Z. Bian, J.A. Jansen, The performance of human dental pulp stem cells on different three-dimensional scaffold materials, *Biomaterials* 27 (2006) 5658–5668.
- [34] W. Zhang, X.F. Walboomers, S. Shi, M. Fan, J.A. Jansen, Multilineage differentiation potential of stem cells derived from human dental pulp after cryopreservation, *Tissue Eng.* 12 (10) (2006) 2813–2823.
- [35] J. Yu, Z. Deng, J. Shi, H. Zhai, X. Nie, H. Zhuang, Y. Li, Y. Jin, Differentiation of dental pulp stem cells into regular-shaped dentin-pulp complex induced by tooth germ cell conditioned medium, *Tissue Eng.* 12 (11) (2006) 3097–3105.
- [36] O. Tecles, P. Laurent, S. Zygouritsas, A.S. Burger, J. Camps, J. Dejou, I. About, Activation of human dental pulp progenitor/stem cells in response to odontoblast injury, *Arch. Oral Biol.* 50 (2005) 103–108.
- [37] A. Stokowski, S. Shi, T. Sun, P.M. Bartold, S.A. Koblar, S. Gronthos, EphB/ephrin-B interaction mediates adult stem cell attachment, spreading, and migration: implications for dental tissue repair, *Stem Cells* 25 (2007) 156–164.
- [38] W. Sonoyama, Y. Liu, D. Fang, T. Yamaza, B.M. Seo, C. Zhang, H. Liu, S. Gronthos, C.Y. Wang, S. Shi, S. Wang, Mesenchymal stem cell-mediated functional tooth regeneration in Swine, *PLoS ONE* 1 (2006) e79.
- [39] H. Liu, S. Gronthos, S. Shi, Dental pulp stem cells, *Methods Enzymol.* 419 (2006) 99–113.
- [40] L. Casagrande, L.G. Mattuella, F.B. de Araujo, J. Eduardo, Stem cells in dental practice: perspectives in conservative pulp therapies, *J. Clin. Pediatr. Dent.* 31 (2006) 25–27.
- [41] M. Nakashima, A. Akamine, The application of tissue engineering to regeneration of pulp and dentin in endodontics, *J. Endod.* 31 (2005) 711–718.
- [42] M. Nakashima, Bone morphogenetic proteins in dentin regeneration for potential use in endodontic therapy, *Cytokine Growth Factor Rev.* 16 (2005) 369–376.
- [43] W. Zhang, X.F. Walboomers, J.G. Wolke, Z. Bian, M.W. Fan, J.A. Jansen, Differentiation ability of rat postnatal dental pulp cells in vitro, *Tissue Eng.* 11 (2005) 357–368.
- [44] R.B. Rutherford, BMP-7 gene transfer to inflamed ferret dental pulps, *Eur. J. Oral Sci.* 109 (2001) 422–424.
- [45] M. Nakashima, K. Iohara, M. Ishikawa, M. Ito, A. Tomokiyo, T. Tanaka, A. Akamine, Stimulation of reparative dentin formation by ex vivo gene therapy using dental pulp stem cells electroporated with growth/differentiation factor 11 (Gdf11), *Hum. Gene Ther.* 15 (2004) 1045–1053.
- [46] M. Goldberg, N. Six, F. Decup, K. Bourd, K. Palmier, E. Salih, A. Veis, J.J. Lasfargues, Mineralization of the dental pulp: contributions of tissue engineering to tomorrow's therapeutics in odontology, *Pathol. Biol. (Paris)* 50 (2002) 194–203.
- [47] M.T. Duailibi, S.E. Duailibi, C.S. Young, J.D. Bartlett, J.P. Vacanti, P.C. Yelick, Bioengineered teeth from cultured rat tooth bud cells, *J. Dent. Res.* 83 (2004) 523–528.
- [48] P.G. Robey, Post-natal stem cells for dental and craniofacial repair, *Oral Biosci.* 2 (2005) 83–90.
- [49] T.A. Mitsiadis, Y. Chéraud, P. Sharpe, J. Fontaine-Perus, Development of teeth in chick embryos after mouse neural crest transplantations, *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 100 (2003) 6541–6545.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

-A-

Abe Y, Aida Y, Abe T, Hirofujii T, Anan H, Maeda K (2000). Development of mineralized nodules in fetal rat mandibular osteogenic precursor cells: requirement for Dexamethasone but not for β -Glycerophosphate. *Calcif Tissue Int* 66:66-69.

Aberg T, Wozney J, Thesleff I (1997). Expression patterns of bone morphogenetic proteins (Bmps) in the developing mouse tooth suggest roles in morphogenesis and cell differentiation. *Dev Dyn* 210(4):383-96.

About I, Bottero MJ, De Denato P, Camps J, Franquin JC, Mitsiadis TA (2000). Human dentin production in vitro. *Biol Cell Research* 258:33-41.

Allard B, Couble ML, Magloire H, Bleicher F (2000). Characterization and gene expression of high conductance calcium-activated potassium channels displaying mechanosensitivity in human odontoblasts. *J Biol Chem* 275(33):25556-61.

Allard B, Magloire H, Couble ML, Maurin JC, Bleicher F (2006). Voltage-gated sodium channels confer excitability to human odontoblasts: possible role in tooth pain transmission. *J Biol Chem* 281(39):29002-10.

Alliot-Licht B, Hurtrel D and Gregoire M (2001). Characterization of alpha-smooth muscle actin positive cells in mineralized human dental pulp cultures. *Arch Oral Biol* 46:221-228.

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

Arana-Chavez VE, Katchburian E (1997). Development of tight junctions between odontoblasts in early dentinogenesis as revealed by freeze-fracture. *Anat Rec* 248(3):332-8.

Arana-Chavez VE, Massa LF (2004). Odontoblasts: the cells forming and maintaining dentine. *Int J Biochem Cell Biol* 36(8):1367-73.

Arany S, Nakata A, Kameda T, Koyota S, Ueno Y, Sugiyama T (2006). Phenotype properties of a novel spontaneously immortalized odontoblast-lineage cell line. *Biochem Biophys Res Commun* 342(3):718-24

Asakura A, Rudnicki MA (2002). Side population cells from diverse adult tissues are capable of in vitro hematopoietic differentiation. *Exp Hematol* 30(11):1339-45.

-B-

Barnard R, Ng KW, Martin TJ, Waters MJ (1991). Growth hormone (GH) receptors in clonal osteoblast-like cells mediate a mitogenic response to GH. *Endocrinology* 128(3):1459-64.

Baumann G (2001). Growth hormone binding protein 2001. *J Pediatr Endocrinol Metab* 14(4):355-75.

Bègue-Kirn C, Smith AJ, Loriot M, Kupferle C, Ruch JV, Lesot H (1994). Comparative analysis of TGF beta s, BMPs, IGF1, msxs, fibronectin, osteonectin and bone sialoprotein gene expression during normal and in vitro-induced odontoblast differentiation. *Int J Dev Biol* 38(3):405-20.

Bègue-Kirn C, Smith AJ, Ruch JV, Wozney JM, Purchio A, Hartmann D, Lesot H (1992). Effects of dentin proteins, transforming growth factor beta 1 (TGF beta 1) and bone morphogenetic protein 2 (BMP2) on the differentiation of odontoblast in vitro. *Int J Dev Biol* 36(4):491-503.

Bellows CG, Heersche JN, Aubin JE (1990). Determination of the capacity for proliferation and differentiation of osteoprogenitor cells in the presence and absence of dexamethasone. *Dev Biol* 140(1):132-138.

Beresford JN, Joyner CJ, Devlin C, Triffitt JT (1994) The effects of dexamethasone and 1,25-dihydroxyvitamin D3 on osteogenic differentiation of human marrow stromal cells in vitro. *Arch Oral Biol* 39:941-947.

Bigeard H and Sommermater L (1991). Retard dentaire et microdentie chez l'enfant atteint de déficit en hormone somatotrope. *J Biol Buccale* 19:291-296.

Bradford M (1976). A rapid and sensitive method for quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248-254.

Brighton CT, Lorich DG, Kupcha R, Reilly TM, Jones AR, Woodbury RA, 2nd (1992) The pericyte as a possible osteoblast progenitor cell. *Clin Orthop Relat Res* 275:287-299.

Brock DP, Marty-Roix R, Spector M (2002). Alpha-smooth-muscle actin in and contraction of porcine dental pulp cells. *J Dent Res* 81(3):203-8.

Butler WT, Ritchie H (1995). The nature and functional significance of dentin extracellular matrix proteins. *Int J Dev Biol* 39(1):169-79.

-C-

Camilleri S, McDonald F (2006). Runx2 and dental development. *Eur J Oral Sci* 114(5):361-73.

Canfield AE, Doherty MJ, Wood AC, Farrington C, Ashton B, Begum N, Harvey B, Poole A, Grant ME, Boot-Handford RP (2000). Role of pericytes in vascular calcification: a review. *Z Kardiol* 89(Suppl 2):20-27.

Chanson P, Salenave S (2008). Acromegaly. *Orphanet J Rare Dis* 25:3-17.

Chen S, Rani S, Wu Y, Unterbrink A, Gu TT, Gluhak-Heinrich J, Chuang HH, Macdougall M (2005). Differential regulation of dentin sialophosphoprotein expression by Runx2 during odontoblast cytodifferentiation. *J Biol Chem* 280(33):29717-27.

Chihara, K and Sugimoto T (1997). The action of GH/IGF-I/IGFBP in osteoblasts and osteoclasts. *Horm Res* 48 Suppl 5:45-49.

Coelho MJ, Trigo Cabral A, Fernandes MH (2000a). Human bone cell cultures in biocompatibility testing. Part I: osteoblastic differentiation of serially passaged human bone marrow cells cultured in α -MEM and DMEM. *Biomaterials* 21:1087-1094.

Coelho MJ, Fernandes MH (2000b). Human bone cell cultures in biocompatibility testing. Part II: effect of ascorbic acid, b-glycerophosphate and dexamethasone on osteoblastic differentiation. *Biomaterials* 21:1095-1102.

Couble ML, Farges JC, Bleicher F, Perrat-Mabillon B, Boudeulle M, Magloire H (2000). Odontoblast differentiation of human dental pulp cells in explant cultures. *Calcif Tissue Int* 66(2):129-138.

-D-

D'Aquino R, De Rosa A, Laino G, Caruso F, Guida L, Rullo R, Checchi V, Laino L, Tirino V, Papaccio G (2009). Human dental pulp stem cells: from biology to clinical applications. *J Exp Zool B Mol Dev Evol* 312:408-15.

D'Souza RN, Litz M (1995). Analysis of tooth development in mice bearing a TGF-beta 1 null mutation. *Connect Tissue Res* 32:41-6.

D'Souza RN, Cavender A, Sunavala G, Alvarez J, Ohshima T, Kulkarni AB, MacDougall M (1997). Gene expression patterns of murine dentin matrix protein 1 (Dmp1) and dentin sialophosphoprotein (DSPP) suggest distinct developmental functions in vivo. *J Bone Miner Res* 12:2040-2049.

D'Souza RN, Aberg T, Gaikwad J, Cavender A, Owen M, Karsenty G, Thesleff I (1999). *Cbfa1* is required for epithelial-mesenchymal interactions regulating tooth development in mice. *Development* 126(13):2911-20.

Diaz-Flores L, Gutierrez R, Lopez-Alfonso A, Gonzalez R Varela H (1992). Pericytes as a supplementary source of osteoblasts in periosteal osteogenesis. *Clinical Orthoped Related Res* (275):280-286.

Doherty MJ, Ashton BA, Walsh S, Beresford JN, Grant ME, Canfield AE (1998). Vascular pericytes express osteogenic potential in vitro and in vivo. *J Bone Miner Res* 13(5):828-38.

Doherty MJ, Canfield AE (1999). Gene expression during vascular pericyte differentiation. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 9(1):1-17.

Durand SH, Flacher V, Roméas A, Carrouel F, Colomb E, Vincent C, Magloire H, Couble ML, Bleicher F, Staquet MJ, Lebecque S, Farges JC (2006). Lipoteichoic acid increases TLR and functional chemokine expression while reducing dentin formation in in vitro differentiated human odontoblasts. *J Immunol* 176(5):2880-7.

-E-

Eagle H (1959). Amino acid metabolism in mammalian cell culture. *Science* 130:432-437

-F-

Farges JC, Keller JF, Carrouel F, Durand SH, Romeas A, Bleicher F, Lebecque S, Staquet MJ (2009). Odontoblast in the dental pulp immune response. *J. Exp. Zool (Mol. Dev. Evol.)* 312:425-436.

Farges JC, Romeas A, Mélin M, Pin JJ, Lebecque S, Lucchini M, Bleicher, Magloire H (2003). TGF- β 1 induces accumulation of dendritic cells in the odontoblast layer. *J Dent Res* 82:652-656.

Farrington-Rock C, Crofts NJ, Doherty MJ, Ashton BA, Griffin-Jones C, Canfield AE (2004). Chondrogenic and adipogenic potential of microvascular pericytes. *Circulation* 110(15):2226-32.

Feng JQ, Huang H, Lu Y, Ye L, Xie Y, Tsutsui TW, Kunieda T, Castranio T, Scott G, Bonewald LB, Mishina Y (2003). The Dentin matrix protein 1 (Dmp1) is specifically expressed in mineralized, but not soft, tissues during development. *J Dent Res* 82(10):776-80.

Fisher LW, Torchia DA, Fohr B, Young MF, Fedarko NS (2001). Flexible structures of SIBLING proteins, bone sialoprotein, and osteopontin. *Biochem Biophys Res Commun* 280(2):460-5.

Fisher LW, Fedarko NS (2003). Six genes expressed in bones and teeth encode the current members of the SIBLING family of proteins. *Connect Tissue Res* 44 Suppl 1:33-40.

-G-

Gahete MD, Durán-Prado M, Luque RM, Martínez-Fuentes AJ, Quintero A, Gutiérrez-Pascual E, Córdoba-Chacón J, Malagón MM, Gracia-Navarro F, Castaño JP (2009). Understanding the multifactorial control of growth hormone release by somatotropes. *Ann NY Acad Sci* 1163:137-53.

Gaikwad JS, Cavender A, D'Souza RN (2001a). Identification of tooth-specific downstream targets of Runx2. *Gene* 279(1):91-7.

Gaikwad JS, Hoffmann M, Cavender A, Bronckers AL, D'Souza RN (2001b). Molecular insights into the lineage-specific determination of odontoblasts: the role of *Cbfa1*. *Adv Dent Res* 15:19-24.

Giustina A, Mazziotti G, Canalis E (2008). Growth hormone, insulin-like growth factors, and the skeleton. *Endocr Rev* 29(5):535-59.

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

Goldberg M, Lacerda-Pinheiro S, Jegat N, Six N, Septier D, Priam F, Bonnefoix M, Tompkins K, Chardin H, Denbesten P, Veis A, Poliard A (2006). The impact of bioactive molecules to stimulate tooth repair and regeneration as part of restorative dentistry. *Dent Clin North Am* 50(2):277-98.

Goldberg M, Farges JC, Lacerda-Pinheiro S, Six N, Jegat N, Decup F, Septier D, Carrouel F, Durand S, Chaussain-Miller C, Denbesten P, Veis A, Poliard A (2008). Inflammatory and immunological aspects of dental pulp repair. *Pharmacol Res* 58(2):137-47.

Goldberg M, Six N, Chaussain C, DenBesten P, Veis A, Poliard A (2009). Dentin extracellular matrix molecules implanted into exposed pulps generate reparative dentin: a novel strategy in regenerative dentistry. *J Dent Res* 88(5):396-399.

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

Gronthos S, Graves SE, Ohta S, Simmons PJ (1994). The STRO-1+ fraction of adult human bone marrow contains the osteogenic precursors. *Blood* 84:4164-4173.

Gronthos S, Zannettino AC, Graves SE, Ohta S, Hay SJ, Simmons PJ (1999) Differential cell surface expression of the STRO-1 and alkaline phosphatase antigens on discrete developmental stages in primary cultures of human bone cells. *J Bone Miner Res* 14:47-56.

Gronthos S, Mankani M, Brahim J, Robey PG, Shi S (2000). Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 97:13625-13630.

Gronthos S, Brahim J, Li W, Fisher LW, Cherman N, Boyde A, DenBesten P, Robey PG, Shi S (2002) Stem cell properties of human dental pulp stem cells. *J Dent Res* 81:531-535.

Guicheux J, Heymann D, Rousselle AV, Gouin F, Pilet P, Yamada S and Daculsi G (1998a). Growth hormone stimulatory effects on osteoclastic resorption are partly mediated by insulin-like growth factor I: an in vitro study. *Bone* 22:25-31.

Guicheux J, Heymann D, Gouin F, Pilet P, Faivre A and Daculsi G (1998b). Growth hormone stimulates multinucleated cell formation in long-term bone marrow cultures. *Eur J Cell Biol* 75:59-65.

-H-

Haddad M, Lefranc G, Aftimos G. Local application of IGF1 on dental pulp mechanically exposed; in vivo study on rabbit (2003). *Bull Group Int Rech Sci Stomatol Odontol* Jan-Apr;45(1):12-7.

Hahn CL, Liewehr FR (2007a). Innate immune responses of the dental pulp to caries. *J Endod* 33(6):643-51.

Hahn CL, Liewehr FR (2007b). Update on the adaptive immune responses of the dental pulp. *J Endod* 33(7):773-81.

Hanks CT, Fang D, Sun Z, Edwards CA, Butler WT (1998). Dentin-specific proteins in MDPC-23 cell line. *Eur J Oral Sci* 106 Suppl 1:260-6.

Hansson LI, Stenstrom A and Thorngren KG (1978a). Effect of hypophysectomy on dentin production in maxillary incisors in the rat. *Scand J Dent Res* 86:72-79.

Hansson LI, A. Stenstrom A and Thorngren KG (1978b). Effect of thyroxine and growth hormone on dentin production in maxillary incisors in the rat, *Scand J Dent Res* 86:169-173.

Hao J, Shi S, Niu Z, Xun Z, Yue L, Xiao M (1997). Mineralized nodule formation by human dental papilla cells in culture. *Eur J Oral Sci* 105(4):318-324.

Hao J, Zou B, Narayanan K, George A (2004). Differential expression patterns of the dentin matrix proteins during mineralized tissue formation. *Bone* 34(6):921-32.

Harvey S, Hull KL (1997). Growth hormone. A paracrine growth factor? *Endocrine* 7(3):267-79.

He G, Dahl T, Veis A, George A (2003). Dentin matrix protein 1 initiates hydroxyapatite formation in vitro. *Connect Tissue Res* 44 Suppl 1:240-5.

Hennen G (2001). *Endocrinologie*. Editions De Boeck.

Hirst KL, Simmons D, Feng J, Aplin H, Dixon MJ, MacDougall M (1997). Elucidation of the sequence and the genomic organization of the human dentin matrix acidic phosphoprotein 1 (DMP1) gene: exclusion of the locus from a causative role in the pathogenesis of dentinogenesis imperfecta type II. *Genomics* 42(1):38-45.

Huang B, Maciejewska I, Sun Y, Peng T, Qin D, Lu Y, Bonewald L, Butler WT, Feng J, Qin C (2008). Identification of full-length dentin matrix protein 1 in dentin and bone. *Calcif Tissue Int* 82(5):401-10.

Huq NL, Cross KJ, Ung M, Reynolds EC (2005). A review of protein structure and gene organisation for proteins associated with mineralised tissue and calcium phosphate stabilisation encoded on human chromosome 4. *Arch Oral Biol* 50(7):599-609.

-I-

Ibuki T, Kido MA, Kiyoshima T, Terada Y, Tanaka T (1996). An ultrastructural study of the relationship between sensory trigeminal nerves and odontoblasts in rat dentin/pulp as demonstrated by the anterograde transport of wheat germ agglutinin-horseradish peroxidase (WGA-HRP). *J Dent Res* 75(12):1963-70.

Iohara K, Nakashima M, Ito M, Ishikawa M, Nakasima A, Akamine A (2004). Dentin regeneration by dental pulp stem cell therapy with recombinant human bone morphogenetic protein 2. *J Dent Res* 83(8):590-5.

Iohara K, Zheng L, Ito M, Tomokiyo A, Matsushita K, Nakashima M (2006). Side population cells isolated from porcine dental pulp tissue with self-renewal and multipotency for dentinogenesis, chondrogenesis, adipogenesis, and neurogenesis. *Stem Cells* 24(11):2493-503.

Iohara K, Zheng L, Wake H, Ito M, Nabekura J, Wakita H, Nakamura H, Into T, Matsushita K, Nakashima M (2008). A novel stem cell source for vasculogenesis in ischemia: subfraction of side population cells from dental pulp. *Stem Cells* 26(9):2408-18.

-J-

Jegat N, Septier D, Veis A, Poliard A, Goldberg M (2007). Short-term effects of amelogenin gene splice products A+4 and A-4 implanted in the exposed rat molar pulp. *Head Face Med* 3:40-48.

João SM, Arana-Chavez VE (2004). Tight junctions in differentiating ameloblasts and odontoblasts differentially express ZO-1, occludin, and claudin-1 in early odontogenesis of rat molars. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol* 277(2):338-43.

Jontell M, Okiji T, Dahlgren U, Bergenholtz G (1998). Immune defense mechanisms of the dental pulp. *Crit Rev Oral Biol Med* 9(2):179-200.

Joseph BK, Savage NW, Young WG, Gupta GS, Breier BH, Waters MJ (1993). Expression and regulation of insulin-like growth factor-I in the rat incisor. *Growth Factors* 8(4):267-75.

Joseph BK, Savage NW, Young WG and Waters MJ (1994). Prenatal expression of growth hormone receptor/binding protein and insulin-like growth factor-I (IGF-I) in the enamel organ. Role for growth hormone and IGF-I in cellular differentiation during early tooth formation?. *Anat Embryol (Berl)* 189:489-494.

Joseph BK, Savage NW, Daley TJ, Young WG (1996). In situ hybridization evidence for a paracrine/autocrine role for insulin-like growth factor-I in tooth development. *Growth Factors* 13(1-2):11-7.

Julien M., Magne D, Masson M, Rolli-Derkinderen M, Chassande O, Cario-Toumaniantz C, Cherel Y, Weiss P and J. Guicheux J (2007). Phosphate stimulates Matrix Gla Protein expression in chondrocytes through the ERK signaling pathway. *Endocrinology* 148(2):530-7.

-K-

Kagayama M, Akita H, Sasano Y (1995). Immunohistochemical localization of connexin 43 in the developing tooth germ of rat. *Anat Embryol (Berl)* 191(6):561-8.

Kassem M., Mosekilde L and Eriksen EF (1994). Growth hormone stimulates proliferation of normal human bone marrow stromal osteoblast precursor cells in vitro. *Growth Regul* 4:131-135.

Kasugai S, Adachi M, Ogura H (1988). Establishment and characterization of a clonal cell line (RPC-C2A) from dental pulp of the rat incisor. *Arch Oral Biol* 33(12):887-91.

Kasugai S, Shibata S, Suzuki S, Susami T, Ogura H (1993). Characterization of a system of mineralized-tissue formation by rat dental pulp cells in culture. *Arch Oral Biol* 38(9):769-777.

Kelly PA, Bachelot A, Kedzia C, Hennighausen L, Ormandy CJ, Kopchick JJ, Binart N (2002). The role of prolactin and growth hormone in mammary gland development. *Mol Cell Endocrinol* 197(1-2):127-31.

Kim CH, Cheng SL, Kim GS (1999). Effects of dexamethasone on proliferation, activity, and cytokine secretion of normal human bone marrow stromal cells: possible mechanisms of glucocorticoid-induced bone loss. *J Endocrinol* 162(3):371-379.

Kim JW, Simmer JP (2007). Hereditary dentin defects. *J Dent Res* 86(5):392-9.

Kosowicz J, Rzymiski K (1977). Abnormalities of tooth development in pituitary dwarfism. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 44(6):853-63.

Kuru L, Griffiths GS, Petrie A, Olsen I (1999). Alkaline phosphatase activity is upregulated in regenerating human periodontal cells. *J Periodontal Res* 34(2):123-7

-L-

Lacerda-Pinheiro S, Jegat N, Septier D, Priam F, Bonnefoix M, Bitard J, Kellermann O, Tompkins K, Veis A, Goldberg M, Poliard A (2006). Early in vivo and in vitro effects of amelogenin gene splice products on pulp cells. *Eur J Oral Sci.* 2006 114 Suppl 1:232-8; discussion 254-6, 381-2.

Lai CF, Chaudhary L, Fausto A, Halstead LR, Ory DS, Avioli LV and Cheng SL (2001). Erk is essential for growth, differentiation, integrin expression, and cell function in human osteoblastic cells. *J Biol Chem* 276:14443-14450.

Laino G, Carinci F, Graziano A, d'Aquino R, Lanza V, De Rosa A, Gombos F, Caruso F, Guida L, Rullo R, Menditti D, Papaccio G (2006). In vitro bone production using stem cells derived from human dental pulp. *J Craniofac Surg* May 17(3):511-5.

Laino G, d'Aquino R, Graziano A, Lanza V, Carinci F, Naro F, Pirozzi G, Papaccio G (2005). A new population of human adult dental pulp stem cells: a useful source of living autologous fibrous bone tissue (LAB). *J Bone Miner Res* 20(8):1394-402.

Lesot H, Lisi S, Peterka R, Mitolo V, Ruch JV (2001). Epigenetic signals during odontoblast differentiation. *Adv Dent Res* 15:8-13.

Leung K, Rajkovic IA, Peters E, Markus I, Van Wyk JJ, Ho KK (1996). Insulin-like growth factor I and insulin down-regulate growth hormone (GH) receptors in rat osteoblasts: evidence for a peripheral feedback loop regulating GH action. *Endocrinology* 137(7):2694-702.

Levy MM, Joyner CJ, Viridi AS, Reed A, Triffitt JT, Simpson AH, Kenwright J, Stein H, Francis MJ (2001). Osteoprogenitor cells of mature human skeletal muscle tissue: an in vitro study. *Bone* 29:317-322.

Li H., Bartold PM, Zhang CZ, Clarkson RW, Young WG and Waters MJ (1998). Growth hormone and insulin-like growth factor I induce bone morphogenetic proteins 2 and 4: a mediator role in bone and tooth formation?, *Endocrinology* 139:3855-3862.

Lichanska AM, Waters MJ (2008). New insights into growth hormone receptor function and clinical implications. *Horm Res* 69(3):138-45.

Liu H, Li W, Shi S, Habelitz S, Gao C, Denbesten P (2005). MEPE is downregulated as dental pulp stem cells differentiate. *Arch Oral Biol* 50(11):923-8.

Liu J, Jin T, Chang S, Ritchie HH, Smith AJ, Clarkson BH (2007). Matrix and TGF-beta-related gene expression during human dental pulp stem cell (DPSC) mineralization. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 43:120-8.

Lopez-Cazaux S, Bluteau G, Magne D, Lieubeau B, Guicheux J and Alliot-Licht B (2006). Culture medium modulates the behaviour of human dental pulp-derived cells: technical note. *Eur Cell Mater* 11:35-42.

Lovschall H, Fejerskov O, Flyvbjerg A (2001). Pulp-capping with recombinant human insulin-like growth factor I (rhIGF-I) in rat molars. *Adv Dent Res* 15:108-12.

Lu Y, Ye L, Yu S, Zhang S, Xie Y, McKee MD, Li YC, Kong J, Eick JD, Dallas SL, Feng JQ (2007). Rescue of odontogenesis in *Dmp1*-deficient mice by targeted re-expression of *DMP1* reveals roles for *DMP1* in early odontogenesis and dentin apposition in vivo. *Dev Biol* 303(1):191-201.

-M-

MacDougall M, Selden JK, Nydegger JR, Carnes DL (1998a). Immortalized mouse odontoblast cell line MO6-G3 application for in vitro biocompatibility testing. *Am J 11 Spec No*:S11-6.

MacDougall M, Gu TT, Luan X, Simmons D, Chen J (1998b). Identification of a novel isoform of mouse dentin matrix protein 1: spatial expression in mineralized tissues. *J Bone Miner Res* 13(3):422-31.

Maeno S, Niki Y, Matsumoto H, Morioka H, Yatabe T, Funayama A, Toyama Y, Taguchi T, Tanaka J (2005). The effect of calcium ion concentration on osteoblast viability, proliferation and differentiation in monolayer and 3D culture. *Biomaterials* 26(23):4847-55.

Magloire H, Lesage F, Couble ML, Lazdunski M, Bleicher F (2003). Expression and localization of TREK-1 K⁺ channels in human odontoblasts. *J Dent Res* 82(7):542-5.

Magloire H, Couble ML, Romeas A, Bleicher F (2004). Odontoblast primary cilia: facts and hypotheses. *Cell Biol Int* 28(2):93-9.

- Magloire H, Couble ML, Thivichon-Prince B, Maurin JC, Bleicher F (2009). Odontoblast: a mechano-sensory cell. *J Exp Zool B Mol Dev Evol* 312(5):416-24.
- Magne D, Bluteau G, Lopez-Cazaux S, Weiss P, Pilet P, Ritchie H, Daculsi G and Guicheux J (2004). Development of an Odontoblast In Vitro Model to Study Dentin Mineralization. *Connect Tissue Res* 45:101-108.
- Masur SK, Dewal HS, Dinh TT, Erenburg I, Petridou S (1996). Myofibroblasts differentiate from fibroblasts when plated at low density. *Proc Natl Acad Sci* 13:4219-4223.
- Maurin JC, Couble ML, Didier-Bazes M, Brisson C, Magloire H, Bleicher F (2004). Expression and localization of reelin in human odontoblasts. *Matrix Biol* 23(5):277-85
- Maurin JC, Delorme G, Machuca-Gayet I, Couble ML, Magloire H, Jurdic P, Bleicher F (2005). Odontoblast expression of semaphorin 7A during innervation of human dentin. *Matrix Biol* 24(3):232-8.
- McCulloch CA, Tenenbaum HC (1986). Dexamethasone induces proliferation and terminal differentiation of osteogenic cells in tissue culture. *Anat Rec* 215(4):397-402.
- Meazza C, Pagani S, Travaglini P, Bozzola M (2004). Effect of growth hormone (GH) on the immune system. *Pediatr Endocrinol Rev Aug;1 Suppl* 3:490-5.
- Miura M, Gronthos S, Zhao M, Lu B, Fisher LW, Robey PG, Shi S (2003). SHED: stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *Proc Natl Acad Sci USA* 100:5807-5812.
- Møller N, Jørgensen JO (2009). Effects of growth hormone on glucose, lipid, and protein metabolism in human subjects. *Endocr Rev* 30(2):152-77.
- Moule AJ, Li H, Bartold PM (1995). Donor variability in the proliferation of human dental fibroblasts. *Australian Dental Journal* 40(2):110-114.
- Morales O, Samuelsson MK, Lindgren U and Haldosen LA (2004). Effects of 1alpha,25-dihydroxyvitamin D3 and growth hormone on apoptosis and proliferation in UMR 106 osteoblast-like cells. *Endocrinology* 145, 87-94.
- Morel G, Chavassieux P, Barenton B, Dubois PM, Meunier PJ, Boivin G (1993). Evidence for a direct effect of growth hormone on osteoblasts. *Cell Tissue Res* 273(2):279-86.
- Mori K, Shioi A, Jono S, Nishizawa Y, Morii H (1999). Dexamethasone enhances in vitro vascular calcification by promoting osteoblastic differentiation of vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 19(9):2112-8.
- Mutoh N, Tani-Ishii N, Tsukinoki K, Chieda K, Watanabe K (2007). Expression of toll-like receptor 2 and 4 in dental pulp. *J Endod* 33(10):1183-6.

-N-

- Nakashima M (1991). Establishment of primary cultures of pulp cells from bovine permanent incisors. *Arch Oral Biol* 36(9):655-63.
- Nakashima M (1994). Induction of dentin formation on canine amputated pulp by recombinant human bone morphogenetic proteins (BMP)-2 and -4. *J Dent Res* 73(9):1515-22.
- Nakashima M (2005). Bone morphogenetic proteins in dentin regeneration for potential use in endodontic therapy. *Cytokine Growth Factor Rev* 16(3):369-76.
- Nakashima M, Iohara K, Zheng L (2006). Gene therapy for dentin regeneration with bone morphogenetic proteins. *Curr Gene Ther* 6(5):551-60.

Nancy A, Zalzal S, Gotoh Y, McKee MD (1996). Ultrastructural characterization and immunolocalization of osteopontin in rat calvarial osteoblast primary cultures. *Microscopy Research And technique* 33:214-231.

Nancy A (2007). *Ten Cate's Oral Histology: Development, Structure, and Function*. Editions Elsevier Health Sciences.

Narayanan K, Srinivas R, Ramachandran A, Hao J, Quinn B, George A (2001). Differentiation of embryonic mesenchymal cells to odontoblast-like cells by overexpression of dentin matrix protein 1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(8):4516-21.

Narayanan NS, Horst NK, Laubach M (2006). Reversible inactivations of rat medial prefrontal cortex impair the ability to wait for a stimulus. *Neuroscience* 139(3):865-76.

Nefussi JR, Ollivier A, Oboeuf M, Forest N (1997). Rapid nodule evaluation computer-aided image analysis procedure for bone nodule quantification. *Bone* 20(1):5-16.

Nie X, Luukko K, Kettunen P (2006). BMP signalling in craniofacial development. *Int J Dev Biol* 50(6):511-21.

-O-

Olney RC (2003). Regulation of bone mass by growth hormone. *Med Pediatr Oncol* 41(3):228-34.

Onishi T, Kinoshita S, Shintani S, Sobue S, Ooshima T (1999). Stimulation of proliferation and differentiation of dog dental pulp cells in serum-free culture medium by insulin-like growth factor. *Arch Oral Biol* 44(4):361-71.

-P-

Palosaari H, Pennington CJ, Larmas M, Edwards DR, Tjäderhane L, Salo T (2003). Expression profile of matrix metalloproteinases (MMPs) and tissue inhibitors of MMPs in mature human odontoblasts and pulp tissue. *Eur J Oral Sci* 111(2):117-27

Panagakos FS (1998). Transformation and preliminary characterization of primary human pulp cells. *J Endod* 24(3):171-5.

Perry BC, Zhou D, Wu X, Yang FC, Byers MA, Chu TM, Hockema JJ, Woods EJ, Goebel WS (2008). Collection, cryopreservation, and characterization of human dental pulp-derived mesenchymal stem cells for banking and clinical use. *Tissue Eng Part C Methods* 14(2):149-56.

Pfäffle RW, Blankenstein O, Wüller S, Kentrup H (1999). Combined pituitary hormone deficiency: role of Pit-1 and Prop-1. *Acta Paediatr Suppl* 88(433):33-41.

Piette et Goldberg (2001). *La dent normale et pathologique*. Editions De Boeck

Pissiotis E and Spangberg L (1993). The importance of the culture medium on human dental pulp cell attachment. *Arch Oral Biol* 38(8):641-647.

Piwien-Pilipuk G, Huo JS, Schwartz J (2002). Growth hormone signal transduction. *J Pediatr Endocrinol Metab* 15(6):771-86.

Priam F, Ronco V, Locker M, Bourd K, Bonnefoix M, Duchêne T, Bitard J, Wurtz T, Kellermann O, Goldberg M, Poliard A (2005). New cellular models for tracking the odontoblast phenotype. *Arch Oral Biol* 50(2):271-7.

Prime SS, Pring M, Davies M, Paterson IC (2004). TGF-beta signal transduction in oro-facial health and non-malignant disease (part I). *Crit Rev Oral Biol Med* 15(6):324-36.

Proudfoot D, Skepper JN, Shanahan CM, Weissberg PL (1998) Calcification of human vascular cells in vitro is correlated with high levels of matrix Gla protein and low levels of osteopontin expression. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 18:379-388.

-Q-

Qin C, Brunn JC, Cook RG, Orkiszewski RS, Malone JP, Veis A, Butler WT (2003). Evidence for the proteolytic processing of dentin matrix protein 1. Identification and characterization of processed fragments and cleavage sites. *J Biol Chem* 278(36):34700-8.

Qin C, D'Souza R, Feng JQ (2007). Dentin matrix protein 1 (DMP1): new and important roles for biomineralization and phosphate homeostasis. *J Dent Res* 86(12):1134-41.

Qin C, Baba O, Butler WT (2004). Post-translational modifications of sibling proteins and their roles in osteogenesis and dentinogenesis. *Crit Rev Oral Biol Med* 15(3):126-36.

Qin C, Brunn JC, Cadena E, Ridall A, Tsujigiwa H, Nagatsuka H, Nagai N, Butler WT (2002). The expression of dentin sialophosphoprotein gene in bone. *J Dent Res* 81(6):392-4.

-R-

Renard E, Lopez-Cazaux S, Guicheux J, Weiss P, Laboux O, Alliot-Licht B (2007). Stem cells of dental pulp. *C R Biol* 330(9):635-43.

Ritchie HH, Liu J, Kasugai S and Moller P (2002). A mineralizing rat dental pulp cell subline expressing collagen type I and dentin sialoprotein-phosphophoryn transcripts, *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 38:25-29.

Rosen T, Johannsson G, Johannsson JO, Bengtsson BA (1995). Consequences of growth hormone deficiency in adults and the benefits and risks of recombinant human growth hormone treatment. A review paper. *Horm Res* 43(1-3):93-9.

Rowe PS (2004). The wrickkened pathways of FGF23, MEPE and PHEX. *Crit Rev Oral Biol Med* 15(5):264-81.

Ruch JV, Lesot H, Begue- Kirn C (1995). Odontoblast differentiation. *Int. J. dev. Biol* 39:51-68.

-S-

San Miguel SM, Goseki-Sone M, Sugiyama E, Watanabe H, Yanagishita M, Ishikawa I (1999). Tissue-non-specific alkaline phosphatase mRNA expression and alkaline phosphatase activity following application of retinoic acid in cultured human dental pulp cells. *Arch Oral Biol* 44(10):861-9.

Sarnat H, Kaplan I, Pertzalan A, Laron Z (1988). Comparison of dental findings in patients with isolated growth hormone deficiency treated with human growth hormone (hGH) and in untreated patients with Laron-type dwarfism. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1988 66(5):581-6.

Sasaki T, Nakagawa K, Higashi S (1982). Ultrastructure of odontoblasts in kitten tooth germs as revealed by freeze-fracture. *Arch Oral Biol* 27(10):897-904.

Schor AM, Allen TD, Canfield AE, Sloan P and Shor SL (1990). Pericytes derived from the retinal microvasculature undergo calcificatio in vitro. *Journal of cell Science* (97):449-461.

Schor AM, Canfield AE, Sutton AB, Arciniegas E, Allen TD (1995) Pericyte differentiation. *Clin Orthop*:81-91.

Six N, Decup F, Lasfargues JJ, Salih E, Goldberg M (2002). Osteogenic proteins (bone sialoprotein and bone morphogenetic protein-7) and dental pulp mineralization. *J Mater Sci Mater Med* 13(2):225-32.

Shepro D, Morel NM (1993). Pericyte physiology. *Faseb J* 7(11):1031-8.

Shi S, Robey PG, Gronthos S (2001) Comparison of human dental pulp and bone marrow stromal stem cells by cDNA microarray analysis. *Bone* 29:532-539.

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

Shiba H, Mouri Y, Komatsuzawa H, Ouhara K, Takeda K, Sugai M, Kinane DF, Kurihara H (2003). Macrophage inflammatory protein-3alpha and beta-defensin-2 stimulate dentin sialophosphoprotein gene expression in human pulp cells. *Biochem Biophys Res Commun* 306(4):867-871.

Simmons PJ, Torok-Storb B (1991). Identification of stromal cell precursors in human bone marrow by a novel monoclonal antibody, STRO-1. *Blood* 78:55-62.

Smid JR, Rowland JE, Young WG, Coschigano KT, Kopchick JJ, Waters MJ (2007). Mouse molar dentin size/shape is dependent on growth hormone status. *J Dent Res* 86(5):463-8.

Smith AJ, Lesot H (2001). Induction and regulation of crown dentinogenesis: embryonic events as a template for dental tissue repair? *Crit Rev oral biol med* 12:425-37.

Sreenath T, Thyagarajan T, Hall B, Longenecker G, D'Souza R, Hong S, Wright JT, MacDougall M, Sauk J, Kulkarni AB (2003). Dentin sialophosphoprotein knockout mouse teeth display widened predentin zone and develop defective dentin mineralization similar to human dentinogenesis imperfecta type III. *J Biol Chem* 278(27):24874-80.

Stanislawski L, Carreau JP, Pouchelet M, Chen ZH, Goldberg M (1997). In vitro culture of human dental pulp cells: some aspects of cells emerging early from the explant. *Clin Oral Investig* 1(3):131-40.

Staquet MJ, Durand SH, Colomb E, Roméas A, Vincent C, Bleicher F, Lebecque S, Farges JC (2008). Different roles of odontoblasts and fibroblasts in immunity. *J Dent Res* 87(3):256-61.

Steitz SA, Speer MY, Curinga G, Yang HY, Haynes P, Aebersold R, Schinke T, Karsenty G, Giachelli CM (2001) Smooth muscle cell phenotypic transition associated with calcification: upregulation of Cbfa1 and downregulation of smooth muscle lineage markers. *Circ Res* 89:1147-1154.

Stewart K, Walsh S, Screen J, Jefferiss CM, Chainey J, Jordan GR, Beresford JN (1999) Further characterization of cells expressing STRO-1 in cultures of adult human bone marrow stromal cells. *J Bone Miner Res* 14:1345-1356.

Suzuki S, Sreenath T, Haruyama N, Honeycutt C, Terse A, Cho A, Kohler T, Müller R, Goldberg M, Kulkarni AB (2009). Dentin sialoprotein and dentin phosphoprotein have distinct roles in dentin mineralization. *Matrix Biol* 28(4):221-9.

-T-

Takahashi MO, Takahashi Y, Iida K, Okimura Y, Kaji H, Abe H and Chihara K (1999). Growth hormone stimulates tyrosine phosphorylation of focal adhesion kinase (p125(FAK)) and actin stress fiber formation in human osteoblast-like cells, Saos2, *Biochem Biophys Res Commun* 1999 263:100-106.

Takaya K, Ariyasu H, Kanamoto N, Iwakura H, Yoshimoto A, Harada M, Mori K, Komatsu Y, Usui T, Shimatsu A, Ogawa Y, Hosoda K, Akamizu T, Kojima M, Kangawa K, Nakao K (2000). Ghrelin strongly stimulates growth hormone release in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 85(12):4908-11.

Tanase S and Bawden JW (1996a). The immunohistochemical localization of signal-transduction pathway components Jak1, Jak2, Jak3, Tyk2 and STAT-1 during early enamel and dentine formation in rat molars. *Arch Oral Biol* 41:925-940.

Tanase S. and Bawden JW (1996b). The immunohistochemical localization of stat-2, -3, -4 and -5 during early enamel and dentine formation in rat molars. *Arch Oral Biol* 41:1149-1160.

Téclès O, Laurent P, Zygouritsas S, Burger AS, Camps J, Dejou J, About I (2005). Activation of human dental pulp progenitor/stem cells in response to odontoblast injury. *Arch Oral Biol* 50(2):103-8.

Tetè S, Nargi E, Mastrangelo F, Zizzari V, D'Apolito G, Traini T, Costanzo G, Dadorante V, D'Alimonte I, Caputi S, Caciagli F, Ciccarelli R (2008). Changes in matrix extracellular phosphoglycoprotein expression before and during in vitro osteogenic differentiation of human dental papilla mesenchymal cells. *Int J Immunopathol Pharmacol* 21(2):309-18.

Tuggle CK, Trenkle A (1996). Control of growth hormone synthesis. *Domest Anim Endocrinol* 13(1):1-33.

Tsukamoto Y, Fukutani S, Shin-Ike T, Kubota T, Sato S, Suzuki Y and Mori M (1992). Mineralized nodule formation by cultures of human dental pulp-derived fibroblasts. *Arch Oral Biol* 37(12):1045-1055.

Tziafas D, Smith AJ, Lesot H (2000). Designing new treatment strategies in vital pulp therapy. *J Dent* 28(2):77-92.

Tziafas D, Belibasakis G, Veis A, Papadimitriou S (2001). Dentin regeneration in vital pulp therapy: design principles. *Adv Dent Res* 15:96-100.

-U-

Unda FJ, Martín A, Hernandez C, Pérez-Nanclares G, Hilario E, Aréchaga J (2001). FGFs-1 and -2, and TGF beta 1 as inductive signals modulating in vitro odontoblast differentiation. *Adv Dent Res* 15:34-7.

-V-

Vainio S, Karavanova I, Jowett A, Thesleff I (1993). Identification of BMP-4 as a signal mediating secondary induction between epithelial and mesenchymal tissues during early tooth development. *Cell* 75(1):45-58.

Velloso CP. Regulation of muscle mass by growth hormone and IGF-I (2008). *Br J Pharmacol* 154(3):557-68.

Veerayutthwilai O, Byers MR, Pham TT, Darveau RP, Dale BA (2007). Differential regulation of immune responses by odontoblasts. *Oral Microbiol Immunol* 22(1):5-13.

-W-

Walsh S, Jefferiss C, Stewart K, Jordan GR, Screen J, Beresford JN (2000). Expression of the developmental markers STRO-1 and alkaline phosphatase in cultures of human marrow stromal cells: regulation by fibroblast growth factor (FGF)-2 and relationship to the expression of FGF receptors 1-4. *Bone* 27:185-195.

Walsh S, Jordan GR, Jefferiss C, Stewart K, Beresford JN (2001). High concentrations of dexamethasone suppress the proliferation but not the differentiation or further maturation of human osteoblast precursors in vitro: relevance to glucocorticoid-induced osteoporosis. *Rheumatology (Oxford)* 40:74-83.

Werner H, Katz J (2004). The emerging role of the insulin-like growth factors in oral biology. *J Dent Res* 83(11):832-6.

Woelfle J, Billiard J, Rotwein P (2003a). Acute control of insulin-like growth factor-I gene transcription by growth hormone through Stat5b. *J Biol Chem* 278(25):22696-702.

Woelfle J, Chia DJ, Rotwein P (2003b). Mechanisms of growth hormone (GH) action. Identification of conserved Stat5 binding sites that mediate GH-induced insulin-like growth factor-I gene activation. *J Biol Chem* 278(51):51261-6.

Woods EJ, Perry BC, Hockema JJ, Larson L, Zhou D, Goebel WS (2009). Optimized cryopreservation method for human dental pulp-derived stem cells and their tissues of origin for banking and clinical use. *Cryobiology* 16.

-X-Y-

Yamamura T (1985). Differentiation of pulpal cells and inductive influences of various matrices with reference to pulpal wound healing. *J Dent Res* (64):530-40.

Yang X, Walboomers XF, van den Dolder J, Yang F, Bian Z, Fan M, Jansen JA (2008). Non-viral bone morphogenetic protein 2 transfection of rat dental pulp stem cells using calcium phosphate nanoparticles as carriers. *Tissue Eng* 14(1):71-81.

Yang X, van der Kraan PM, van den Dolder J, Walboomers XF, Bian Z, Fan M, Jansen JA (2007). STRO-1 selected rat dental pulp stem cells transfected with adenoviral-mediated human bone morphogenetic protein 2 gene show enhanced odontogenic differentiation. *Tissue Eng* 13(11):2803-12.

Ye L, MacDougall M, Zhang S, Xie Y, Zhang J, Li Z, Lu Y, Mishina Y, Feng JQ (2004). Deletion of dentin matrix protein-1 leads to a partial failure of maturation of predentin into dentin, hypomineralization, and expanded cavities of pulp and root canal during postnatal tooth development. *J Biol Chem* 279(18):19141-8.

Yoshida N, Yoshida K, Nakamura H, Iwaku M, Ozawa H (1996). Immunohistochemical localization of HLA-DR-positive cells in unerupted and erupted normal and carious human teeth. *J Dent Res* 75(8):1585-9.

Young WG, Zhang CZ, Li H, Osborne P, Waters MJ (1992). The influence of growth hormone on cell proliferation in odontogenic epithelia by bromodeoxyuridine immunocytochemistry and morphometry in the Lewis dwarf rat. *J Dent Res* 71(11):1807-11.

Young WG, Growth hormone and insulin-like growth factor-I in odontogenesis (1995). *Int J Dev Biol* 39:263-272.

Young WG, Li H, Xiao Y, Waters MJ, Bartold PM (2001). Growth-hormone-stimulated dentinogenesis in Lewis dwarf rat molars. *J Dent Res* 80(8):1742-7.

-Z-

Zhang CZ, Young WG, Waters MJ (1992a). Immunocytochemical localization of growth hormone receptor in rat maxillary teeth. *Arch Oral Biol* 37(2):77-84.

Zhang CZ, Young WG, Li H, Clayden AM, Garcia-Aragon J and Waters MJ (1992b). Expression of growth hormone receptor by immunocytochemistry in rat molar root formation and alveolar bone remodeling. *Calcif Tissue Int* 50:541-546.

Zhang CZ, Young WG, Breipohl W, Doehrn S, Li H, Waters MJ (1994). Growth hormone regulates an N-acetylgalactosamine component in odontogenesis: a specific lectin-binding study in the Lewis dwarf rat. *J Oral Pathol Med* 23(5):193-9.

Zhang CZ, Li H, Bartold PM, Young WG, Waters MJ (1995). Effect of growth hormone on the distribution of decorin and biglycan during odontogenesis in the rat incisor. *J Dent Res* 74(10):1636-43

Zhang CZ, Li H, Young WG, Bartold PM, Chen C, Waters MJ (1997). Evidence for a local action of growth hormone in embryonic tooth development in the rat. *Growth Factors* 14(2-3):131-43.

Zhang J, Tu Q, Chen J. Applications of transgenics in studies of bone sialoprotein (2009). *J Cell Physiol* 220(1):30-4

Zhang W, Walboomers XF, Jansen JA (2008). The formation of tertiary dentin after pulp capping with a calcium phosphate cement, loaded with PLGA microparticles containing TGF-beta1. *J Biomed Mater Res* 85(2):439-44.

Zhu T, Goh EL, Graichen R, Ling L and Lobie PE (2001). Signal transduction via the growth hormone receptor. *Cell Signal* 13:599-616.

Serena Lopez Cazaux

Thèse de doctorat, Nantes (2009)

Différenciation odontoblastique : rôle du milieu et de l'hormone de croissance

Le tissu pulpaire dentaire est constitué de différentes populations cellulaires et d'une matrice extracellulaire riche en molécules inductrices. Sa physiopathologie complexe et unique n'est pas encore complètement élucidée. Ce travail porte sur deux aspects de la physiologie pulpaire. Dans une première partie, nous nous sommes intéressés aux cellules souches pulpaires avec une étude des conditions de culture favorables au recrutement des précurseurs d'intérêt dans l'optique d'une application en ingénierie tissulaire. Pour cela, nous avons testé deux milieux de culture (le RPMI et le MEM) sur un modèle primaire de cellules pulpaires humaines et nous avons étudié les effets d'un glucocorticoïde connu pour induire la minéralisation en culture, la dexaméthasone (Dex). Nos résultats montrent que les conditions de culture ont une influence sur la prolifération et la différenciation des cellules pulpaires humaines et sur le recrutement des cellules souches de la pulpe dentaire. Le MEM est le milieu le plus favorable au recrutement des pericytes (SMA+, cellules souches adultes potentielles) et la Dex permet d'augmenter la proportion de cellules STRO-1 +, cellules souches d'intérêt en ingénierie des tissus minéralisés (dent, os). Dans la deuxième partie de ce travail, nous avons étudié l'effet d'un facteur de croissance : l'hormone de croissance (GH) sur une lignée de cellules odontoblastiques, les M2H4. Le but de notre étude est d'apporter, *in vitro*, des éléments nouveaux sur le rôle de la GH dans la dentinogenèse et ses mécanismes d'action sur les odontoblastes. Nos résultats montrent pour la première fois la présence du récepteur de l'hormone de croissance sur une lignée odontoblastique. De plus, nous avons pu mettre en évidence que la GH stimule la prolifération cellulaire des M2H4 et induit leur différenciation. Ces résultats permettent de supposer que la GH intervient au cours de la dentinogenèse.

Mots clés : pulpe dentaire, odontoblaste, cellule souche, milieu de culture, dexaméthasone, hormone de croissance

Odontoblastic differentiation : role of culture medium and of growth hormone

Dental pulp contains different cells type and an extracellular matrix rich in inductive agents and presents a complex physiology not yet fully understood. This study concern two aspects of dental pulp physiology. First we focused on dental pulp stem cells with an evaluation of the culture conditions which favor the recruitment of this precursor for an application in tissue engineering. For this purpose, we have tested on human pulp cells the effects of two media of cells culture (MEM and RPMI) and we have evaluated the outcomes of a glucocorticoid well known to induce mineralization in culture, the dexamethasone (Dex). Our results show that culture conditions influence the proliferation and the differentiation of pulp cells and modify the recruitment of dental pulp stem cells. MEM favor the recruitment of the pericyte (SMA+ cells that are considered as stem cells) and Dex increases the proportion of STRO-1 + cells (stem cells of interest in tissue engineering for bone and tooth). In the second part of this study, we have investigated in vitro the effects of Growth Hormone (GH) on a rat odontoblastic cell Une: M2H4. Our aim is to increase the knowledge of the role of GH in dentinogenesis and in the physiology of odontoblasts. Our results show for the first time that M2H4 express GH receptor. In addition we revealed that GH increases both proliferation and differentiation of the odontoblastic cells in culture. This data allows us to hypothesize that GH could have a potential role in dentinogenesis.

Key words : dental pulp, odontoblast, stem cell, culture medium, dexamethasone, growth hormone