

UNIVERSITE DE NANTES

UNITE DE FORMATION ET DE RECHERCHE
D'ODONTOLOGIE

Année 2005

Thèse n°:

Les cellules souches et la pulpe dentaire

THESE POUR LE DIPLOME D'ETAT DE
DOCTEUR EN CHIRURGIE DENTAIRE

*Présentée
et soutenue publiquement par :*

Mademoiselle RENARD Emmanuelle
Née le 10/04/1979

Le 13/12/2005, devant le jury ci-dessous :

Président : Monsieur le Professeur A. JEAN
Assesseur : Monsieur le Professeur O. LABOUX
Assesseur : Madame le Docteur S. DAJEAN

Directeur de thèse : Madame le Docteur B. ALLIOT-LICHT

SOMMAIRE

1. INTRODUCTION.....	4
2. LES CELLULES SOUCHES.....	6
2.1. DÉFINITIONS	6
2.1.1. <i>Les cellules souches embryonnaires (ES)</i>	7
2.1.1.1. Les sources des cellules souches embryonnaires humaines.....	8
2.1.1.2. L'utilisation des cellules souches embryonnaires humaines.....	9
2.1.2. <i>Les cellules souches fœtales</i>	11
2.1.2.1. Les cellules souches somatiques fœtales :.....	11
2.1.2.2. Les cellules souches de la lignée germinale (EG).....	12
2.1.3. <i>Les cellules souches adultes (SCA)</i>	12
2.1.3.1. Les localisations :	13
2.1.3.2. Leurs caractéristiques :.....	14
2.1.3.3. Leur capacité de mise en culture et de prolifération :	15
2.1.3.4. Les conditions d'utilisation des cellules souches adultes en thérapeutique humaine. 15	
2.1.3.4.1. Sur le plan fondamental :	16
2.1.3.4.2. Dans l'hypothèse d'une application pratique future :	16
2.1.3.5. Les avantages des cellules souches mésenchymateuses adultes par rapport aux cellules embryonnaires.....	17
2.2. LES CELLULES SOUCHES MÉSENCHYMATEUSES.....	19
2.2.1. <i>Les cellules souches stromales de la moelle osseuse</i>	19
2.2.2. <i>Les marqueurs</i>	20
2.2.3. <i>Les conditions de différenciation in vitro</i>	23
2.2.4. <i>La culture primaire des BMSSCs humaines</i>	23
2.2.5. <i>Les BMSSCs et leurs applications pour le complexe orofacial</i>	24
3. LE COMPLEXE DENTINO-PULPAIRE.....	26
3.1. LA PULPE DENTAIRE	26
3.1.1. <i>Définition</i>	26
3.1.2. <i>L'aspect anatomique</i>	26
3.1.3. <i>La description histologique</i>	26
3.1.3.1. La composante cellulaire.....	27
3.1.3.1.1. Les fibroblastes	27
3.1.3.1.2. Les cellules de défense	28
3.1.3.1.3. Les odontoblastes	28
3.1.3.2. La composante inter-cellulaire.....	29
3.1.3.3. La composante sanguine et lymphatique	30
3.1.3.4. La composante nerveuse	30
3.2. LES ODONTOBLASTES.....	31
3.2.1. <i>Leur origine et leur différenciation</i>	31
3.2.1.1. L'origine embryologique.....	31
3.2.1.2. La régulation moléculaire de la différenciation	33
3.2.1.2.1. Le rôle des facteurs de croissance	33
3.2.1.2.2. Le récepteur trans-membranaire Notch.....	34
3.2.1.2.3. Les glycoprotéines N-cadhérine :	34
3.2.1.2.4. Les connexines	35
3.2.2. <i>Leur structure et ultrastructure</i>	35

3.2.3.	<i>La dentine primaire et secondaire</i>	36
3.2.4.	<i>La dentine réactionnelle</i>	38
3.3.	LA DENTINOGENÈSE DE RÉPARATION.....	39
3.4.	LES PRÉCURSEURS ODONTOBLASTIQUES	42
3.5.	LES PÉRICYTES	44
3.5.1.	<i>Définition</i>	44
3.5.2.	<i>Les marqueurs</i>	44
3.5.2.1.	CD146	44
3.5.2.2.	3G5	44
3.5.2.3.	α -SMA.....	45
3.5.3.	<i>Les possibilités de différenciation des péricytes</i>	46
3.5.3.1.	La mise en évidence de la différenciation ostéogénique des péricytes....	47
3.5.3.2.	La mise en évidence de la différenciation chondrogénique des péricytes	47
3.5.3.3.	La mise en évidence de la différenciation adipogénique des péricytes....	48
4.	LES MÉTHODES D'ÉTUDE DES CELLULES SOUCHES PULPAIRES	50
4.1.	LA CULTURE CELLULAIRE	50
4.1.1.	<i>La culture d'explants pulpaire</i> s.....	50
4.1.2.	<i>La culture de cellules pulpaire</i> s après digestion enzymatique.....	51
4.2.	L'IMMUNO-MARQUAGE DU TISSU PULPAIRE.....	52
4.2.1.	<i>La dent permanente</i>	52
4.2.2.	<i>La dent temporaire</i>	54
4.3.	LA TRANSPLANTATION	55
4.3.1.	<i>Les transplants sous cutanés</i>	55
4.3.1.1.	Le transporteur :HA/TCP	55
4.3.1.2.	Le transporteur :dentine	57
4.3.2.	<i>Les transplants dans le cerveau</i>	58
4.4.	LES CULTURES DE DPSCS AVEC DES FACTEURS D'INDUCTION	59
4.4.1.	<i>Le facteur d'induction adipogénique</i>	59
4.4.2.	<i>Le facteur d'induction odontogénique</i>	60
4.4.3.	<i>Le facteur d'induction chondrogénique</i>	61
5.	L'UTILISATION DES CELLULES SOUCHES DE LA PULPE DENTAIRE : L'INGÉNIERIE TISSULAIRE	62
5.1.	LA RÉPARATION DENTAIRE	62
5.2.	LA RÉGÉNÉRATION PULPAIRE ET DENTINAIRE DANS L'ENDODONTE	63
5.3.	LA RÉGÉNÉRATION DENTAIRE.....	65
6.	CONCLUSION	67

1. INTRODUCTION

Spallanzani, en 1768, a été le premier à découvrir que les Urodèles amphibiens étaient les seuls vertébrés capables de régénérer leur membre après une amputation. Ces urodèles possèdent en effet des cellules avec une capacité de dédifférenciation, avant de proliférer et de se différencier à nouveau pour remplacer le membre manquant. Les cellules de ces amphibiens sont capables de retrouver les capacités des cellules souches. C'est à dire qu'elles récupèrent la capacité d'auto renouvellement, ainsi que la capacité de se différencier en de multiples lignées cellulaires.

Le corps humain possède une remarquable capacité de régénération, les cellules des tissus tels que le sang ou l'épithélium ont une capacité de division très rapide, leur régénération est continue à travers la vie. Mais les cellules de la plupart des autres tissus ont un renouvellement plus lent, qui répond seulement à des signaux biologiques spécifiques. Nous ne possédons pas comme les urodèles, la capacité de régénérer la totalité d'un membre amputé.

Les cellules humaines ne possèdent pas cette capacité de dédifférenciation. Néanmoins, le corps humain possède des cellules ayant conservé la possibilité de se différencier et de produire plusieurs types de lignées cellulaires. Ces cellules sont appelées cellules souches.

L'étude des cellules souches est un sujet scientifique vaste, qui intéresse les chercheurs, les cliniciens et le public. La littérature abondante sur le sujet suggère que virtuellement tous les tissus du corps contiennent des cellules avec une capacité de régénération. Cependant, toutes ces cellules ne répondent pas à toutes les définitions courantes des cellules souches :

- ❖ Capacité à former des clones
- ❖ Capacité d'auto renouvellement
- ❖ Phénotype indifférencié

L'objet de cette thèse est d'étudier les propriétés des cellules souches, de savoir si elles sont présentes dans la pulpe dentaire et de comprendre comment elles pourraient être utilisées au cabinet dentaire.

2. LES CELLULES SOUCHES

2.1. DÉFINITIONS

Le terme de « cellule souche » est utilisé pour désigner une cellule, qui si elle est placée dans un environnement tissulaire approprié, est capable de se multiplier et de produire des cellules spécialisées, qui acquièrent une morphologie et une fonction spécifiques d'un tissu (9).

Ce processus de différenciation est (classiquement) irréversible.

Une cellule souche n'exprime quant à elle aucune spécialisation elle est dite « indifférenciée ».

Il existe deux grands types de cellules souches : les cellules souches embryonnaires (ES) et les cellules souches adultes (SCA).

Les cellules souches embryonnaires se distinguent des cellules souches adultes par une propriété essentielle : elles ont la possibilité de conduire à la formation de tous les tissus de l'organisme, y compris aux cellules de la lignée germinale (constituant les gamètes). Elles sont dites totipotentes, lorsqu'elles peuvent conduire à la constitution d'un organisme entier. Elles sont dites pluripotentes lorsqu'elles perdent cette capacité (9).

Les cellules souches adultes sont, pour leur part, déjà engagées dans un programme tissulaire spécifique, ce qui explique leur hétérogénéité et même si certaines d'entre elles peuvent conduire à la formation ou à la régénération de tissus distincts (multipotence), elles ne sont pas comme leurs homologues embryonnaires, totipotentes (9).

2.1.1. Les cellules souches embryonnaires (ES)

Jusqu'au stade de 8 cellules (3 jours), les cellules mêmes dissociées les unes des autres peuvent former un organisme entier, elles sont totipotentes.

Au stade du blastocyste (5^{ème} au 7^{ème} jour) : l'embryon est constitué de 16 à 40 cellules issues des divisions de l'ovocyte fécondé. Le feuillet externe du blastocyste donnera le placenta.

S'il est implanté dans l'utérus, le blastocyste entier peut se développer en un fœtus viable. A ce stade, chacune des cellules de la masse interne du blastocyste est pluripotente rarement totipotente, bien qu'elles puissent produire tous les feuillets embryonnaires (mésoderme, endoderme, ectoderme) et les tissus qui en dérivent, ainsi que les cellules germinales (47).

Une fois le blastocyste dissocié, les cellules ES qui en sont extraites ont perdu toute possibilité de se développer ultérieurement en embryon, elles sont pluripotentes. Elles peuvent être cultivées au laboratoire à l'infini tout en conservant un génome intact.

Il est donc possible d'obtenir des millions de cellules ES à partir d'un petit nombre de cellules embryonnaires de blastocyste.

Placées dans des conditions de cultures précises, ces cellules ont également la capacité de se différencier en cellules spécialisées correspondant à tous les tissus de l'organisme (cœur, sang, neurones ...). Le mécanisme par lequel les ES sont capables de se différencier en différents types cellulaires est encore inconnu, mais il est clair que l'environnement joue un rôle important (47).

Les cellules ES peuvent reformer un embryon mais à la seule condition qu'elles soient réintroduites dans un blastocyste appelé hôte. En aucun cas, elles ne sont capables de générer, à elles seules, un embryon viable (9).

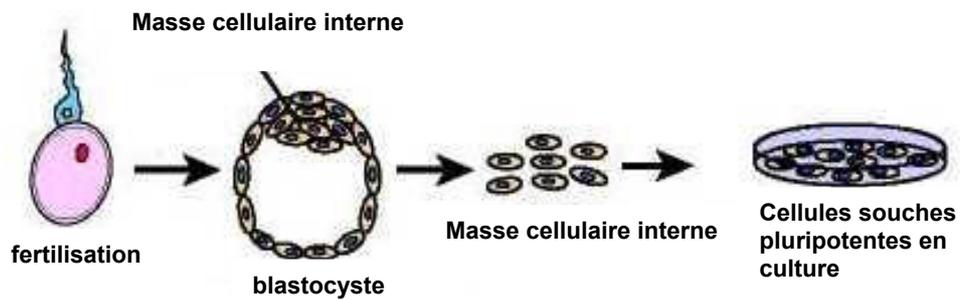


Figure 1 : obtention des cellules souches embryonnaires par fécondation *in vitro*.
www.stemcellnetwork.ca/engage/materials/presentation1-f.ppt

2.1.1.1. Les sources des cellules souches embryonnaires humaines

Elles peuvent provenir :

- ❖ D'embryons surnuméraires issus de la fécondation *in vitro*, dans le cas de procréation médicalement assistée.
- ❖ D'embryons créés, par fécondation *in vitro*, à des fins de recherche.
- ❖ Par clonage : en fusionnant le noyau d'une cellule somatique avec un ovocyte énucléé.

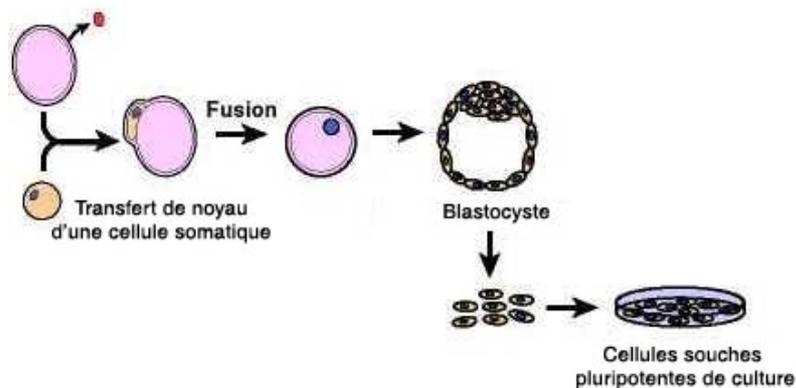


Figure 2 : Cellules souches embryonnaires obtenues par clonage.
www.stemcellnetwork.ca/engage/materials/presentation1-f.ppt

2.1.1.2. L'utilisation des cellules souches embryonnaires humaines

La pluripotence intrinsèque des cellules souches embryonnaires leur confère un avantage unique pour analyser les signaux qui dictent à une cellule souche sa spécification, et pour caractériser les gènes qui sont activés en réponse à ces signaux.

Cette propriété a été exploitée depuis les années 1980 chez la Souris. Chez cette espèce en effet, les cellules souches embryonnaires (ES) sont particulièrement faciles à cultiver.

Leur utilisation a permis des progrès considérables dans la connaissance des gènes clés contrôlant le développement et le fonctionnement des différents tissus et organes (32).

Parmi les autres avantages des cellules ES murines on cite :

- ❖ leur capacité de prolifération quasi illimitée au laboratoire (sans qu'elles soient capables pour autant de reformer un embryon viable). Ceci permet l'accumulation d'un nombre très élevé de cellules, et l'isolement de lignées permanentes ayant les mêmes caractéristiques que les cellules primaires à leur origine. Ce qui autorise la pratique de travaux de recherche.
- ❖ Les cellules ES conservent un génotype et un caryotype normaux, malgré leur taux de prolifération élevé, elles n'accumulent pas de mutations.
- ❖ Les lignées formées par ces cellules sont pures donc leurs potentiels de prolifération et de différenciation sont identiques.
- ❖ Elles se prêtent à une grande facilité d'analyse et de modification de leur génome : on peut y insérer ou délèter des gènes dont on suppose l'importance pour la réalisation d'un programme tissulaire donné, ce qui permet d'analyser (vérifier) les conséquences fonctionnelles de ces perturbations.

- ❖ Le déclenchement de leur différenciation peut s'opérer, à la demande, en tel ou tel tissu, grâce à l'ajout de molécules régulatrices (14,46,50,89).
- ❖ Les cellules embryonnaires constituent certainement une source privilégiée de signaux inducteurs puisque c'est au stade embryonnaire que se décide l'organogenèse, c'est à dire la mise en place des différents organes ou tissus qui constitueront l'organisme adulte. Ces signaux pourraient être (chimiquement) identifiés et « purifiés » à partir de ces cellules ES ou de leurs cellules filles, puis utilisés pour la spécification de cellules souches tissulaires adultes (19).

Néanmoins, même si le fonctionnement de certains tissus est globalement très similaire chez l'homme et chez la souris, il est cependant difficile d'extrapoler à l'homme les conclusions tirées de l'étude des cellules souches embryonnaires de la souris. En effet, les molécules régulatrices divergent, et d'autres critères, comme la taille de l'animal, sa durée de vie, rendent souvent le modèle souris inexploitable dans une perspective thérapeutique (9).

D'autres obstacles se dressent face à l'utilisation des ES humaines dans un but thérapeutique.

- ❖ D'ordre technique : les cellules souches humaines sont difficiles à manipuler, il est difficile de prédire et de reproduire la différenciation en un tissu désiré et pas un autre (47).
- ❖ Un autre défi reste à résoudre : le problème des lois et de la bioéthique, très différentes d'un pays à l'autre :
 - En 2002 le Royaume-Unis a explicitement autorisé le clonage thérapeutique, c'est à dire la création d'embryons à des fins de recherche (64).
 - En France et en Espagne la loi de bioéthique interdit l'utilisation des cellules souches embryonnaires humaines pour la recherche (64).
 - L'Allemagne autorise depuis le 25 avril 2002 l'utilisation de cellules souches embryonnaires humaines à des fins de recherche (64).

- En Suisse, la commission d'éthique autorise sous condition l'emploi d'embryons surnuméraires à des fins de recherche thérapeutique (64).
- Aux Etats-Unis, il existe un agrément qui permet à certains laboratoires spécifiques de pratiquer le clonage des cellules souches embryonnaires humaines à des fins thérapeutiques. Le clonage reproductif est interdit (64).
- Au Canada et en Australie, les recherches menées à partir d'embryons surnuméraires sont autorisées. Le clonage à visée thérapeutique reste interdit (64).
- Israël accepte la création d'embryons par transfert de noyau pour produire des cellules souches dans une optique thérapeutique (64).

2.1.2. Les cellules souches fœtales

Elles sont issues des tissus fœtaux entre la 5ème et la 9ème semaine et sont isolées à partir de fœtus résultant d'avortement. On distinguera deux classes : les cellules somatiques qui représentent les cellules du corps sauf les gamètes qui sont appelées cellules germinales.

2.1.2.1. Les cellules souches somatiques fœtales :

Les tissus fœtaux contiennent des cellules souches : deux de ces tissus sont particulièrement importants dans une perspective thérapeutique, notamment par leur capacité de régénération et de réparation des dommages tissulaires (47) :

- les cellules souches du système nerveux central, dans le traitement de certaines pathologies neurodégénératives (maladie de Parkinson ou de Huntington) (47).
- les hépatocytes fœtaux qui font l'objet de recherche active en vue de transplantation (5).
- Les cellules du myocarde.

2.1.2.2. Les cellules souches de la lignée germinale (EG)

Elles sont issues de l'ébauche du tissu germinale de fœtus. Elles sont pluripotentes. Leur génome est moins stable que celui des ES, ce qui les rend, pour l'instant, inutilisables dans une perspective thérapeutique, alors qu'elles ouvrent d'importantes perspectives en recherche fondamentale (9).

2.1.3. Les cellules souches adultes (SCA)

Il apparaît que la meilleure façon de définir une cellule souche adulte est sa fonction : une cellule souche somatique (pour la distinguer des cellules germinales) assure l'homéostasie, c'est à dire le maintien physiologique d'un organe ou d'un tissu, en remplaçant les cellules mortes, que ce soit naturellement ou après une lésion, assurant ainsi la pérennité et la fonction de l'organe pendant la vie de l'individu.

Elle remplit cette fonction d'une part en se multipliant à l'identique (ce qui évite le tarissement du réservoir de cellules souches), d'autre part en se différenciant, acquérant ainsi les caractéristiques du tissu à réparer (9).

Ce potentiel de régénération est connu depuis plusieurs décennies. Par exemple, la moelle osseuse contient deux types de cellules souches adultes :

Les cellules souches hématopoïétiques qui donnent naissance à tous les types de cellules de la lignée sanguine.

Les cellules souches stromales qui peuvent se différencier en ostéoblastes, chondroblastes, adipocytes...

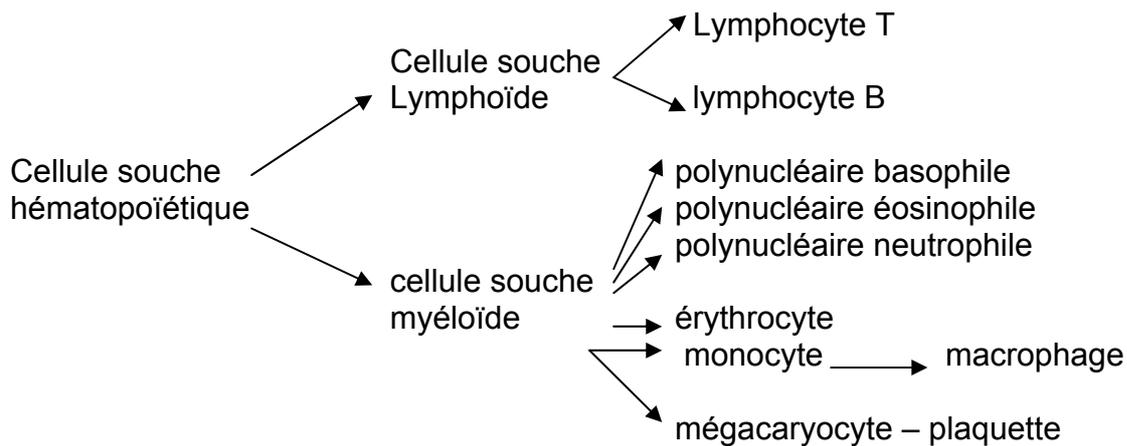


Figure 3 : Différenciation et maturation des cellules hématopoïétiques de la moelle osseuse

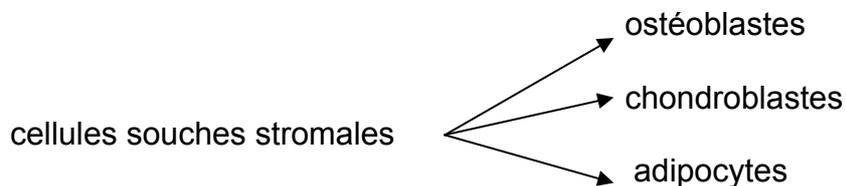


Figure 4 : Différenciation et maturation des cellules stromales de la moelle osseuse

2.1.3.1. Les localisations :

Les cellules souches répondant à cette définition et capables de « réparer » les tissus ont été identifiées avec certitude chez l'homme (9).

Ce sont les :

- Cellules de la moelle osseuse,
- Cellules souches nerveuses,
- Cellules épidermiques,
- Cellules intestinales,
- Cellules osseuses,
- Cellules pancréatiques,
- Cellules hépato-biliaires,
- Cellules musculaires lisses,
- Cellules musculaires squelettiques.
- Cellules de la pulpe dentaire et du ligament alvéolo-dentaire

Les cellules souches de trois tissus (sang, peau, intestin) fonctionnent en permanence, pendant toute la vie, pour renouveler régulièrement l'ensemble des cellules.

Hormis celles de l'intestin, les deux autres sont déjà utilisées avec succès en thérapeutique.

Quant à celles des autres tissus, elles ne sont activées que lorsque la nécessité d'une réparation se fait sentir (9).

2.1.3.2. Leurs caractéristiques :

Les très nombreux travaux expérimentaux réalisés *in vitro* ou après transplantation chez l'animal, permettent d'attribuer aux cellules souches adultes les caractéristiques suivantes qui les distinguent des cellules souches embryonnaires (9) :

- elles ne sont pas considérées comme « pluripotentes » et sont généralement « programmées » par un tissu donné. Elles sont dites multipotentes.
- Elles ne se multiplient pas à l'infini à l'état indifférencié.
- Elles sont très hétérogènes compte tenu de la diversité des tissus de l'organisme auxquels elles appartiennent.

Elles sont multipotentes, elles peuvent produire des cellules de morphologie et de fonction très différentes, généralement groupées au sein d'un même organe ou tissu.

C'est le cas des cellules souches hématopoïétiques, qui produisent toutes les cellules sanguines : globules rouges, blancs, lymphocytes et certaines structures vasculaires.

C'est aussi le cas des cellules souches nerveuses, qui produisent les neurones, mais aussi les cellules accessoires du système nerveux (astrocytes, oligodendrocytes) (9).

De même au niveau du tissu musculaire squelettique humain, il existe des cellules souches (MDSCs : muscle derived stem cells) qui peuvent être activées pour assurer le renouvellement tissulaire en cas de blessure, de maladie ou de destruction. Ces

cellules que l'on qualifiait de monopotentes, se sont avérées capables en culture de se différencier et d'être à l'origine des lignées mésodermique adipocytaire et ostéogénique (4).

2.1.3.3. Leur capacité de mise en culture et de prolifération :

Certaines cellules souches adultes se multiplient très efficacement en culture, en conservant intact leur « potentiel » : les cellules souches nerveuses, épidermiques ou mésenchymateuses appartiennent à cette catégorie.

D'autres n'ont pas ce pouvoir, soit parce qu'elles perdent leur potentiel en se divisant (cellules souches hématopoïétiques), soit qu'elles prolifèrent très peu *in vitro* (cellules souches musculaires).

Ce comportement *in vitro* n'est pas prédictif de leur potentiel prolifératif *in vivo*, mais est essentiel pour leur manipulation dans un but thérapeutique (9).

2.1.3.4. Les conditions d'utilisation des cellules souches adultes en thérapeutique humaine.

Face aux obstacles éthiques et scientifiques qui se dressent devant l'acquisition de cellules souches embryonnaires, l'utilisation des cellules souches adultes en thérapie cellulaire peut s'avérer une technique de choix.

Malheureusement, à l'exception des cellules souches de la peau et du tissu hématopoïétique déjà utilisées avec succès en thérapie réparatrice, l'utilisation d'autres cellules souches tissulaires adultes, pour séduisante qu'elle soit compte tenu des données évoquées ci-dessus, est encore purement spéculative (9).

La rareté des données actuellement publiées chez l'homme, rend indispensable leur étude sur le plan fondamental qui seul documentera leur potentiel intérêt thérapeutique.

De ce qui précède, il apparaît que les principaux objectifs à atteindre dans une optique thérapeutique sont de deux ordres :

2.1.3.4.1. Sur le plan fondamental :

Il est essentiel d'obtenir la preuve que chez l'homme comme chez l'animal, la moelle osseuse, et éventuellement d'autres tissus adultes (dont le muscle) contiennent plusieurs types de cellules souches tissulaires.

Il faut déterminer le degré de multipotence des cellules souches, musculaires, nerveuses ou hématopoïétiques, si elles sont capables de s'orienter vers la fabrication d'un tissu, au choix de l'expérimentateur ?

2.1.3.4.2. Dans l'hypothèse d'une application pratique future :

Il est essentiel de déterminer les conditions d'obtention du nombre de cellules souches adultes (ou de cellules spécialisées obtenues en culture à partir de la différenciation des cellules souches) suffisant et compatible avec la réparation tissulaire *in vivo* chez le patient. Cela implique les opérations suivantes :

- ❖ Définir les facteurs nutritifs dont ces cellules ont besoin pour se multiplier, tout en gardant intacte leur capacité de produire des cellules spécialisées réparant le tissu *in vivo* et caractériser la nature des gènes permettant cette multiplication.
- ❖ Identifier les signaux spécifiques d'environnement tissulaire qui dictent la différenciation des cellules souches pour former ce tissu, et caractériser la nature des gènes activés lors de cette induction (19).
- ❖ Evaluer la fonction des cellules ainsi traitées hors de l'organisme, il faut définir des modèles animaux aussi proches que possibles de la physiologie humaine, et y vérifier la réalité de l'utilisation de cellules souches adultes.

Plusieurs obstacles compliquent l'étude des cellules souches adultes en l'état actuel de nos connaissances : le faible nombre de marqueurs connus permettant de les purifier, l'ignorance de leurs conditions de multiplication et de leur capacité à intégrer et à exprimer des gènes dans une perspective de thérapie génique.

2.1.3.5. Les avantages des cellules souches mésenchymateuses adultes par rapport aux cellules embryonnaires

Plusieurs obstacles majeurs se dressent face à l'utilisation des cellules souches embryonnaires en thérapie humaine :

- ❖ les études chez la souris ont montré que ces cellules étaient la cause de la formation de tératome (tumeur composée de différents tissus étrangers à la région où elle se développe) et de tératoblastome (tératome d'évolution maligne), même lorsque leur différenciation est induite. Ceci à cause de cellules résiduelles qui conservent les propriétés de cellules souches (92).
- ❖ Les cellules souches embryonnaires sont dérivées d'un individu embryonnaire et portent les caractéristiques génétiques de ce donneur. Celles-ci sont reconnues comme étant étrangères par le receveur et peuvent être rejetées. A l'inverse, ces cellules peuvent provoquer la production de cellules lymphoïdes qui vont reconnaître le receveur comme étranger et entraîner des lésions (92).

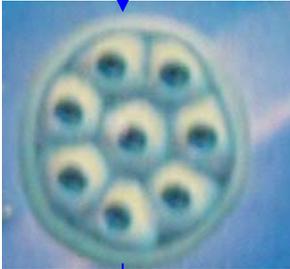
Ces obstacles à l'utilisation des cellules souches embryonnaires n'existent pas avec les cellules souches adultes :

- ❖ Aucune formation tumorale n'a été rapportée avec l'utilisation des cellules souches mésenchymateuses adultes (92).
- ❖ Ces cellules ne sont pas immunogènes puisqu'elles appartiennent au même individu et possèdent la capacité de réguler la réponse immune. Peut-être en supprimant la lignée cellulaire B par l'élaboration d'activine A, un membre de la famille de TGF- β (92).
- ❖ Abondance cellulaire du fait que ces cellules sont retrouvées dans un grand nombre de tissus ou d'organes (92).

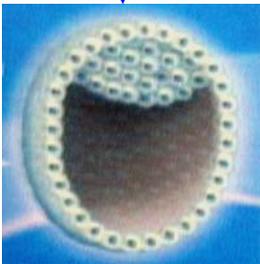
Ces propriétés font des cellules souches adultes des candidates adéquates pour une utilisation en thérapie humaine.



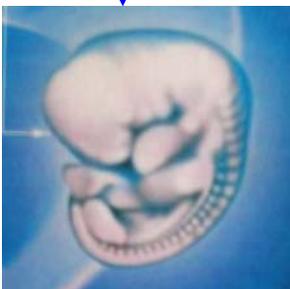
Fécondation



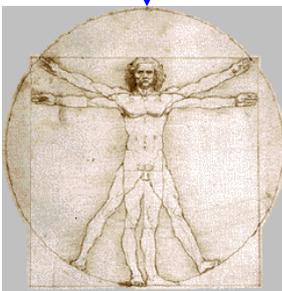
Embryon à 8 cellules 3 jours: les cellules souches embryonnaires (ES) sont totipotentes, chacune d'entre elle peut créer un être complet.



Blastocyste 5 à 7 jours: à ce stade les cellules souches embryonnaires (ES) sont pluripotentes.



Fœtus : à ce stade seules les cellules germinales restent pluripotentes. Les autres cellules dites somatiques sont multipotentes, elles ont déjà commencé leur différenciation.



Chez l'adulte on trouve également des cellules souches, elles servent au maintien et à la réparation du corps. On les retrouve dans différents tissus de l'organisme. Elles peuvent se différencier et former les cellules d'un nombre limité de tissus. Elles sont multipotentes

Figure 5 : les différents types de cellules souches humaines.

2.2. LES CELLULES SOUCHES MÉSENCHYMATEUSES

Les cellules mésenchymateuses également appelées cellules stromales sont des cellules primordiales d'origine mésodermale elles forment le tissu conjonctif de tout le corps. Le mésoderme est envahi par les cellules des crêtes neurales, il se transforme en ectomésenchyme. Les cellules de cet ectomésenchyme sont reconnues comme étant progénitrices, elles sont capables d'auto-renouvellement et servent de précurseurs pour les fibroblastes, l'os, le cartilage, les muscles, les tendons, la graisse, les cellules musculaires lisses et les cellules endothéliales de vaisseaux (11,23,47,61,92). Ce sont donc des cellules souches multipotentes. Il a été rapporté d'autre part que les cellules souches mésenchymateuses sont présentes dans la moelle osseuse, la circulation sanguine et le sang du cordon ombilical (1,8,22).

Les cellules souches de la moelle osseuse vont ici être étudiées de manière plus approfondie, du fait des nombreuses similarités qui existent entre l'os et la dent.

2.2.1. Les cellules souches stromales de la moelle osseuse

La moelle osseuse est composée de deux principaux systèmes distincts : le tissu hématopoïétique proprement dit et le support associé appelé stroma (11,47).

Plusieurs études ont démontré la coopération entre ces deux populations cellulaires. Les cellules hématopoïétiques influencent l'activité des cellules stromales, qui servent de support mécanique à la différenciation des cellules hématopoïétiques. En effet, les cellules du stroma de la moelle osseuse produisent des signaux, qui participent au développement et à la maturation des cellules sanguines (47).

Comme nous l'avons précédemment rapporté, le stroma de la moelle osseuse contient des cellules souches multipotentes (BMSSCs).

L'hétérogénéité des BMSSCs apparaît de façon immédiate à travers l'examen des colonies. En effet, une fois mise en culture, les BMSSCs forment des colonies qui vont pouvoir se différencier en os, adipocytes, chondrocytes dans des conditions de cultures appropriées. Chacune des colonies formées dérive d'un seul type de précurseur : le CFU-F (11). Par comparaison avec les colonies formées par les

cellules hématopoïétiques de la moelle osseuse, les colonies de BMSSCs sont rapidement adhérentes au milieu de culture, ont un pouvoir clonogénique et sont capables de prolifération intensive (11).

L'hétérogénéité des phénotypes des différentes colonies peut être mise en évidence par l'utilisation de réactifs spécifiques.

Les colonies hautement réactives à la phosphatase alcaline, indiquent la présence de cellules osseuses. De même que l'initiation d'une matrice minéralisée peut être identifiée par le rouge Alizarin ou la coloration de Von Kossa pour le calcium.

L'accumulation de cellules adipocytaires parmi les colonies peut être identifiée par la coloration à l'oil red O. Enfin, la chondrogenèse est identifiée par la coloration au bleu alcian, qui colore un glycosaminoglycane spécifique des matrices extracellulaires chondrogéniques (11).

Une autre technique de mise en évidence des précurseurs des différents clones cellulaires peut être utilisée. Il s'agit de l'identification des marqueurs de surfaces des cellules à potentiel ostéogénique, chondrogénique, et adipogénique. Une fois les clones sélectionnés et remis en culture, ils se différencient et forment de nouvelles colonies (11).

2.2.2. Les marqueurs

Les antigènes de surfaces, lorsqu'ils sont identifiés permettent d'isoler les populations de cellules précurseurs. Par exemple les cellules souches de la moelle osseuse peuvent être sélectionnées par l'expression des marqueurs de surface CD49a : l' α 1-intégrine sous-unité de l'antigène (VLA)-1 (récepteur pour le collagène et la laminine) et CD45. Les cellules répondant aux phénotypes de CD49a⁺ /CD45^{+/-} sont des cellules précurseurs de la moelle osseuse, elles incluent aussi les CFU-F (24).

Simmons et Torok-Storb (1991) ont identifié STRO-1 comme antigène de surface des cellules précurseurs de la moelle osseuse. Les études menées sur les cellules porteuses de l'antigène STRO-1 ont montré que dans différentes conditions de cultures, celles-ci étaient capables de se différencier en plusieurs types de cellules

stromales incluant les cellules musculaires lisses, les fibroblastes, les adipocytes et les ostéoblastes (37,40).

Les cellules souches mésenchymateuses humaines en général peuvent être sélectionnées par l'expression des antigènes membranaires suivants (23) :

- Stro-1
- Thy-1
- Vascular cell adhesion molecule-1
- Endogline
- CD49a
- MUC-18/CD146
- SB10/CD166
- CD105

Au cours des différentes étapes de la différenciation, les marqueurs de surface des cellules changent. Tous ne sont pas encore connus ou étudiés.

La lignée ostéoblastique est l'une des plus connue en terme de marqueurs antigéniques. Par exemple Gronthos et coll. (1999) ont identifié les changements qui apparaissent au cours de la différenciation ostéoblastique pour deux antigènes de surface : STRO-1 qui est un marqueur des précurseurs et ALP (phosphatase alcaline) pour les ostéoblastes matures. Quatre phénotypes différents ont été mis en évidence à partir des cellules stromales de la moelle osseuse:

- le phénotype $STRO-1^+ /ALP^-$ qualifie les progéniteurs qui produisent très peu de matrice minéralisée.
- Le phénotype $STRO-1^+ /ALP^+$ représente des préostéoblastes intermédiaires dans les étapes du développement
- Les phénotypes $STRO-1^- /ALP^+$ puis $STRO-1^- /ALP^-$ apparaissent pour les ostéoblastes sécrétoires puis pour les ostéocytes.

D'autres marqueurs sont présents à la surfaces des cellules de la lignée ostéogénique, les voici présentés sous forme de schéma :

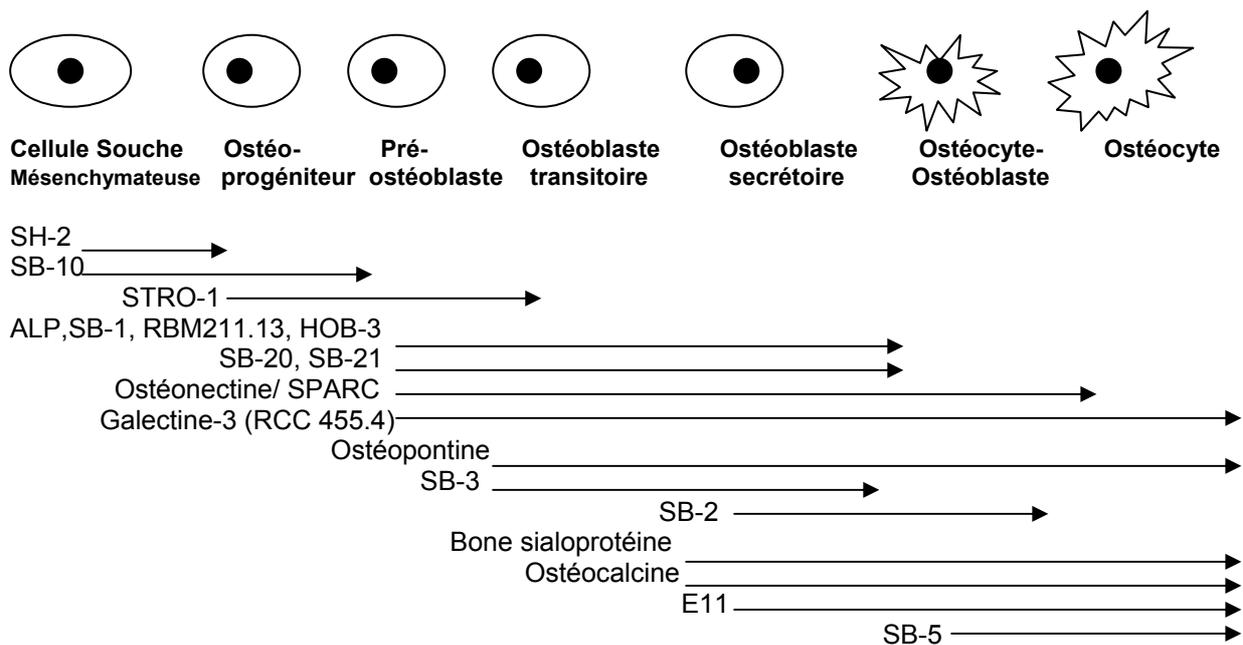


Figure 6 : les marqueurs de surface de la lignée ostéogénique. D'après Bruder et coll.(1997)

Andrea C. et coll. (2004), se sont penchés sur l'analyse des marqueurs spécifiques des précurseurs musculaires MDSCs, notamment au niveau des muscles cranio-faciaux de l'adulte. Ils ont identifié l'antigène CD56 comme étant spécifique des précurseurs des cellules musculaires striées. De la même manière que pour les lignées ostéocytaires on peut établir un diagramme montrant l'expression des antigènes de surface au cours de la différenciation de la lignée des muscles squelettiques.

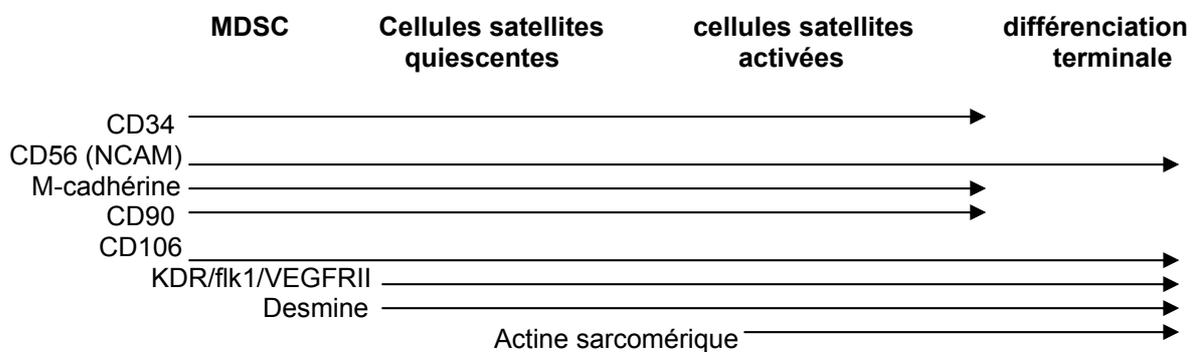


Figure 7 : Diagramme montrant l'expression des molécules de surfaces des MDSCs au cours de leur différenciation. D'après Andrea et coll.(2004)

2.2.3. Les conditions de différenciation *in vitro*

L'analyse du potentiel de différenciation des cellules souches mésenchymateuses n'a pu être mise en place qu'après la découverte des conditions spécifiques de différenciation *in vitro*.

- ❖ Les facteurs ostéogéniques habituellement utilisés en culture sont une combinaison de dexaméthasone, β -glycérophosphate et acide ascorbique phosphate (23,37,61).
- ❖ Les facteurs adipogéniques sont une combinaison de dexaméthasone, de 1-méthyl-3isobutylxanthine, insuline et indométacine (23,61).
- ❖ Le cartilage est obtenu par agrégation de cellules en présence de TGF β et d'acide ascorbique puis d'insuline (23,61).

2.2.4. La culture primaire des BMSSCs humaines

Les cellules mésenchymateuses humaines sont relativement faciles à obtenir, par simple aspiration de moelle osseuse. Les cellules conservent leur potentiel de différenciation en multiples lignées cellulaires (ostéoblastes, adipocytes, chondrocytes, myofibroblastes, et précurseurs de cellules neurales) (82).

Les BMSSCs prolifèrent rapidement et de façon intense, les multiples différenciations ne peuvent se faire qu'après l'expansion en culture. Les cellules obtenues pendant la phase de prolifération pure sont appelées cellules d'auto renouvellement.

La mesure de la quantité des cellules d'auto renouvellement (RS cells) dans les cultures de BMSSCs peut se faire sous lumière dispersée (82).

Cependant la morphologie des cellules après croissance en culture est hétérogène, et elles perdent leur multipotentialité après six ou sept repiquages (passages cellulaires=décollement et réensemencement) (82).

Les méthodes d'isolement et de culture des BMSSCs varient. La plupart des chercheurs utilisent l'adhérence sur milieu plastique comme méthode de référence

pour réaliser la séparation des composants du stroma de la moelle osseuse et les cellules hématopoïétiques (92). L'utilisation de milieux simples, non supplémentés en cytokines, a facilité la croissance de colonies de fibroblastes type CFU-F.

Les cultures primaires de BMSSCs leur permettent de conserver la capacité de se différencier en plusieurs types de tissus mésodermiques (92).

2.2.5. Les BMSSCs et leurs applications pour le complexe orofacial

Krebsbach et coll. (2002) ont proposé l'hypothèse selon laquelle les cellules souches de la moelle osseuse et les cellules souches dentaires pourraient être un jour utilisées pour réparer des défauts osseux cranio-faciaux ou régénérer des dents. Les pertes osseuses cranio-faciales peuvent être d'origine différente :

- ablation chirurgicale des tumeurs cancéreuses
- déficiences osseuses suite à une infection ou à un traumatisme.
- pathologies dégénératives du squelette

Les thérapies actuelles se composent de techniques chirurgicales, de mise en place de greffons osseux autogènes ou de matériaux alloplastiques. Ces techniques présentent des limites du fait :

- des risques liés à la chirurgie
- des complications post-opératoires possibles sur le site de prélèvement et le site d'apposition du greffon.
- du risque de rejet des matériaux alloplastiques

La transplantation, des cellules souches stromales de lignée ostéoblastique, pourrait être une alternative aux auto et allo-greffes, palliant ainsi aux inconvénients précédemment cités.

Des expérimentations sur le modèle animal ont déjà été réalisées. Leur technique consiste en une multiplication cellulaire de cellules progénitrices en laboratoire. Ces cellules sont ensuite chargées sur des transporteurs appropriés et placées localement dans le site du défaut osseux.

Les essais sur le modèle animal ont été concluants, ce qui permet de proposer des essais cliniques chez l'humain (47).

Plusieurs techniques pourraient être envisagées pour régénérer des tissus détruits par une maladie ou un accident :

- stimuler les cellules souches environnantes par l'apport de facteurs de croissance exogènes avec ou sans support.
- Introduire des cellules exogènes, avec ou sans facteurs de croissance et/ ou transporteurs.
- reconstituer des tissus et des organes ou leurs amorces, *ex-vivo* avant l'implantation.

Dans tous les cas, il apparaît que l'efficacité à long terme de ces techniques est hautement dépendante du maintien d'une bonne activité des cellules souches.

Pour régénérer un tissu, il faut tenir compte de ses dimensions.

La transplantation de moelle osseuse, est le seul exemple d'ingénierie tissulaire qui existe en une seule dimension. Il s'agit de remplacer un fluide par un autre. De ce fait cet acte de thérapie par les cellules souches est devenu routinier.

Des avancées récentes, on permis des reconstructions, en deux dimensions, de peau ou de cornée (12).

La reconstruction des structures tridimensionnelles, telles que l'os ou la dent, implique de plus grandes difficultés en terme de maintien de l'espace à régénérer, à l'abri des autres types cellulaires locaux tout en permettant une vascularisation appropriée (33).

La régénération spontanée du parodonte et du complexe pulpo-dentinaire ont permis de supposer la présence dans ces tissus, de cellules souches mésenchymateuses adultes.

Pour le mettre en évidence, il faut rechercher la présence dans la pulpe dentaire de l'un des nombreux marqueurs des cellules souches stromales.

L'antigène de surface STRO-1 est présent sur les précurseurs de plusieurs types de cellules souches stromales, incluant les fibroblastes de la moelle, les ostéoblastes, les chondrocytes, les adipocytes, les cellules musculaires lisses (75).

STRO-1 est un marqueur de surface que l'on peut utiliser pour identifier les cellules souches de la pulpe dentaire. En effet une fois mises en culture, les cellules STRO-1 positives de la pulpe dentaire, ont la capacité de se différencier en *odontoblast-like* et de produire de la dentine (2,91).

3. LE COMPLEXE DENTINO-PULPAIRE

3.1. LA PULPE DENTAIRE

3.1.1. Définition

Il s'agit d'un tissu conjonctif comblant la cavité centrale de la dent, la pulpe joue un rôle physiologique fondamental. Elle produit la dentine à l'aide de ses odontoblastes. La pulpe dentaire assure la nutrition et la sensibilité de la dentine par son réseau vasculaire et son innervation. Enfin, elle est capable d'édifier une nouvelle dentine dans certaines conditions pathologiques (6).

3.1.2. L'aspect anatomique

On lui distingue deux portions:

- la chambre pulpaire située dans la zone coronale
- le canal pulpaire occupant la zone radiculaire

La chambre épouse la forme de la couronne. Sous les cuspidés de la zone masticatrice, elle s'étend dans les cornes pulpaires dont il faut éviter l'ouverture lors des procédés de restauration dentaire. Le canal radiculaire se termine à l'apex par le foramen apical (6).

Une fois la formation dentaire terminée, la pulpe est entourée par une matrice minéralisée. L'espace qu'elle occupe se réduit de manière graduelle du fait de la sécrétion continue de dentine secondaire. Il reste malgré tout une communication entre la pulpe dentaire et le tissu péri-apical au travers du foramen apical (35).

3.1.3. La description histologique

En microscopie optique, on distingue 4 zones dans la pulpe:

- La zone odontoblastique en périphérie
- la zone acellulaire de Weil immédiatement sous-jacente

- La zone riche en cellules.
- la zone centrale, la plus étendue, avec des vaisseaux de gros diamètre et une innervation développée (6).

3.1.3.1. La composante cellulaire

La pulpe adulte contient des cellules responsables de la formation et du renouvellement du complexe non minéralisé (MEC : Matrice Extra-Cellulaire). La plupart des cellules sont des fibroblastes. Des macrophages, des cellules nerveuses et des capillaires y sont aussi observés. Le pouvoir prolifératif de ces cellules à l'intérieur de la pulpe dentaire coronaire apparaît être limitée, du fait du faible espace disponible. On peut supposer que le renouvellement cellulaire suit le phénomène d'apoptose.

De manière superficielle, tous les fibroblastes apparaissent morphologiquement similaires, mais leurs activités de prolifération variables suggèrent qu'elles constituent une population cellulaire hétérogène. Cette hétérogénéité est appuyée par des études réalisées sur des dents temporaires humaines, dans lesquels 183 types de fibroblastes ont été identifiés. Malgré tout, seulement 6 de ces types se sont avérés capables de former des nodules de minéralisation (35).

3.1.3.1.1. Les fibroblastes

Les fibroblastes pulpaire sont des cellules allongées avec un large noyau et un REG (réticulum endoplasmique granuleux) bien développé. L'appareil de Golgi est localisé à côté du noyau et la présence de vésicules de sécrétion reflète la capacité de synthèse de ces cellules. Des lysosomes sont aussi présents, ce qui signifie qu'un même fibroblaste est impliqué simultanément dans le catabolisme et la synthèse des composants de la MEC, particulièrement dans la pulpe jeune.

Les fibroblastes n'existent pas de manière isolée, mais connectés entre eux par des desmosomes et des jonctions de type GAP, qui facilitent la communication intercellulaire. Ceci implique aussi, que si les cellules se déplacent la communication peut être rompue. Cette motilité est probablement facilitée par la présence d'alpha-actin du muscle lisse (α -SMA : α -Smooth-Muscle-Actin). Une protéine qui contribue à

la contraction des cellules et/ou de la matrice extra-cellulaire, identifiée autour des vaisseaux sanguins et à la surface des péricytes (35).

3.1.3.1.2. Les cellules de défense

Les cellules de défense ont aussi été identifiées dans la pulpe saine, incluant plus particulièrement des cellules dendritiques et des histiocytes/macrophages. Des lymphocytes ainsi que des cellules mast sont aussi présentes. La plupart d'entre elles mais pas toutes sont impliquées dans la réaction immunitaire de type II.

Des cellules de morphologie caractéristique des cellules dendritiques et exprimant des molécules de classe II du complexe majeur d'histocompatibilité ont été identifiées dans la pulpe dentaire par Jontell et coll. (1998). Ces cellules se sont avérées être des cellules dendritiques immatures.

Les lymphocytes B sont rarement rencontrés dans la pulpe normale. L'activité phagocytaire est assurée par les macrophages présents. Ces cellules sont plus nombreuses à la périphérie de la pulpe, où elles peuvent participer à l'immuno surveillance du tissu et contribuer à la réponse pulpaire en cas d'atteinte dentinaire (35).

La coopération entre les différentes populations cellulaires dans la pulpe est essentielle à l'homéostasie d'un tissu normal. La médiation de ces interactions n'est pas clairement connue. On sait seulement qu'un facteur de croissance : le TGF- β 1 et ses isoformes sont exprimés de manière physiologique par les cellules pulpaires. Ce facteur de croissance a un potentiel immunosuppresseur et peut jouer un rôle clé dans la régulation de l'activité cellulaire inflammatoire dans la pulpe (35).

3.1.3.1.3. Les odontoblastes

Ce sont les cellules les plus caractéristiques. Elles se disposent en une assise continue en périphérie de la pulpe et émettent, par leur pôle apical, un prolongement cytoplasmique cheminant dans les tubuli dentinaires.

Leur aspect est bien précisé par l'étude en microscopie électronique, il varie avec leur état fonctionnel :

Elles ont un noyau basal à chromatine dispersée en motte périphérique avec plusieurs nucléoles. Dans le cytoplasme on peut observer plusieurs citernes de matériel granulaire. L'appareil de Golgi est très développé.

En cas d'agression cette cellule hautement différenciée est incapable de mitose. Quand la chambre pulpaire est exposée, par exemple en cas de thérapeutique de lésion carieuse, une nouvelle dentine peut se former. Elle dérive non pas des odontoblastes préexistants, mais de nouvelles cellules, différenciées à partir de la zone sous-odontoblastique ou de la zone centrale de la pulpe (6).

3.1.3.2. La omposante inter-cellulaire

Les fibroblastes de la pulpe produisent une matrice extra-cellulaire (MEC) différente de celle de la dentine ou d'autres tissus conjonctifs mous. Dans la pulpe, les espaces intercellulaires sont larges contiennent des fibrilles de collagène de type I et III (respectivement 56 et 41%), à la différence de la dentine qui contient de manière prédominante du collagène de type I, type V(2%) et VI(0,5%). Des microfibrilles de fibrine de 10-14nm de diamètre sont associées aux microfibrilles du collagène type VI (35).

La MEC contient aussi des composants non collagéniques :

- fibronectine prédomine dans la pulpe
- chondroïtine 4 et 6 sulfatate (60%) (CS4 et CS6)
- dermatane sulfatate(34%) (DS)
- kératane sulfatate(2%) (KS)
- glycosaminoglycanes (GAGs)
- protéoglycanes(PGs)

Ce schéma diffère de celui de la dentine, où on retrouve (35):

- CS4(1%), CS6(14%)
- GAGs dont 2% d'acide hyaluronique
- PGs

La quantité de lipide diffère aussi de manière importante entre la pulpe et la dentine.

Les études de la provenance des cellules pulpaire et de leur contrôle par des facteurs de croissance du type BMPs (Protéine de la Morphogénèse osseuse) et des cytokines permettent la compréhension de leur activité sécrétoire.

L'absence de minéralisation de la pulpe peut être expliquée, par l'absence de molécules spécifiques identifiées dans la dentine. On retrouve des molécules comme : la DSP (dentine sialoprotéine), DPP (dentine phospho protéine), DMP-1 et ostéocalcine exprimées de manière prédominante par les odontoblastes (35).

De plus, l'ostéonectine est largement retrouvée dans la papille dentaire du germe de la dent, dans les odontoblastes, mais pas dans la pulpe de la dent adulte.

Ostéopontine et la Bone Sialoprotéine (BSP) sont présentes à la fois dans la pulpe et la dentine, mais elles y diffèrent en quantité. Ceci expliquerait l'incapacité de la pulpe à se minéraliser dans des conditions physiologiques. D'autre part la présence d'inhibiteur de la minéralisation dans la pulpe (haute concentration de PGs) peut aussi contribuer à l'absence de minéralisation (35).

3.1.3.3. Les composantes sanguine et lymphatique

Les vaisseaux sanguins pénètrent et ressortent de la pulpe par le foramen apical et les foramina accessoires. Ils proviennent de l'artère dentaire. La pulpe est constituée d'une grande quantité de capillaires. Ces capillaires sont donc entourés d'artérioles en amont et de veinules en aval. La circulation sanguine est de type terminal, ceci explique la présence de péricytes retrouvés dans la pulpe. Les péricytes sont des cellules situées dans le dédoublement de la membrane basale des artérioles et de veinules.

Il existe d'autre part un réseau de lymphatique pulpaire qui se draine dans les ganglions sous-maxillaires et sous-mentaux, puis cervicaux (6).

3.1.3.4. La composante nerveuse

L'innervation du complexe dentino-pulpaire provient des branches sensibles maxillaires et mandibulaires du trijumeau et des branches sympathiques du ganglion cervical supérieur. On distingue des fibres sensibles et des fibres vasomotrices. Ces

fibres forment un plexus fortement ramifié en périphérie de la pulpe au contact des odontoblastes (6).

3.2. LES ODONTOBLASTES

3.2.1. Leur origine et leur différenciation

3.2.1.1. *L'origine embryologique*

Les odontoblastes dérivent des cellules des crêtes neurales. En effet, pendant la phase de neurulation au cours de l'embryogénèse (à partir de J20), l'ectoblaste : l'un des trois feuillets embryonnaires formés au cours de la gastrulation (J15 à J20) se transforme en neurectoblaste et épiblaste. Le neurectoblaste formera la plaque neurale qui va s'allonger et se creuser pour donner la gouttière neurale. Celle-ci va progressivement se fermer pour former le tube neural entouré des crêtes neurales. Les cellules des crêtes neurales vont migrer de la région dorsale vers des régions bien déterminées des ébauches faciales. Elles possèdent une grande capacité de migration et de différenciation.

Une première migration de cellules provenant des crêtes neurales colonise le mésenchyme dentaire de la région des molaires mandibulaires du premier arc branchial. Une seconde migration se fait vers la masse fronto-nasale.

Les cellules des crêtes neurales sont à l'origine d'éléments du système nerveux et du tissu mésenchymateux :

éléments du système nerveux	neurones	ganglions sensoriels
		nerfs craniens
		ganglions rachidiens
		ganglions du système nerveux autonome
	cellules gliales	cellules satellites des ganglions
		cellules de schwann
	méninges	pie-mère
		arachnoïde
	derme, cartilage, os	face
tissus mésenchymateux		partie du crâne
	stroma conjonctif des glandes	thyroïde
		para-thyroïde
		lacrymales
		salivaires
		hypophyse
	cellules endocrines	cellules de la médulo- surrénales
		cellules à calcitonine
		cellules à glucagon
		insuline (pancréas)
	cellules pigmentaires	mélanocytes
	cellules dentaires	odontoblastes

Tableau 1 : Capacité de différenciation des cellules des crêtes neurales.

Cette capacité de différenciation est importante, elle permettrait d'expliquer la présence de cellules souches au sein de la pulpe dentaire.

Durant l'organogenèse dentaire chez la souris, les cellules de la lignée odontoblastique migrent à partir de la zone centrale de la papille dentaire vers la périphérie entre le 14^{ème} et le 18^{ème} jour de l'embryogenèse. Les pré-odontoblastes de souris se multiplient à travers 14 à 15 cycles de 10 heures chacun. Le nombre de cycles et leur durée restent toujours ignorés chez l'homme (68). Les pré-odontoblastes sont alignés perpendiculairement à la membrane basale, seules les cellules filles adjacentes à cette membrane basale réaliseront la différenciation terminale en odontoblaste. La configuration spatiale, est nécessaire à la morphologie des futurs odontoblastes. Certaines cellules filles plus éloignées de la membrane basale sont incorporées et sont appelées cellules de Höhl (41). Ces cellules interviendraient dans la formation de la dentine réactionnelle, si la lésion dentaire n'a provoqué la mort que de quelques odontoblastes. Elles n'interviendraient pas dans la

formation de dentine de réparation, qui nécessite une forte multiplication cellulaire, que les cellules de Höhl ne sont pas capables d'assurer (35).

3.2.1.2. La régulation moléculaire de la différenciation

3.2.1.2.1. Le rôle des facteurs de croissance

Les facteurs de croissance jouent un rôle clé dans la différenciation physiologique des odontoblastes, ainsi que dans les phénomènes de réparation. Particulièrement le TGF- β (Transforming Growth Factors β) qui peut être directement impliqué dans les signaux de différenciation des odontoblastes et des *odontoblast-like*.

TGF- β 1, TGF- β 3, Bone Morphogenetic Protein-2 (BMP-2) (42), BMP-4, BMP-7, Insulin-like Growth Factor-1 (IGF-1) sont capables d'induire la différenciation des odontoblastes *in vitro* (35).

Les facteurs de croissance exprimés par les odontoblastes matures peuvent être séquestrés à l'intérieur de la matrice dentinaire et être relargués à la suite d'une déminéralisation de la dent (16,29).

D'autres facteurs de croissance, peuvent être sécrétés par les odontoblastes mais ne sont pas séquestrés à l'intérieur de la matrice dentinaire, comme TGF- β 3 sécrété en plus grande quantité par les odontoblastes humains que TGF- β 1, mais non détecté dans la matrice dentinaire (35,81).

Ces facteurs de croissance, exprimés par les odontoblastes peuvent jouer différents rôles sur l'homéostasie du tissu à travers une action autocrine ou paracrine.

Robert-clark et Smith (2000) ont émis l'hypothèse que des facteurs de croissance sécrétés par les odontoblastes pouvaient avoir un pouvoir angiogénique et jouer un rôle important dans la vascularisation du complexe dentino-pulpaire, physiologiquement et durant la réparation des tissus. Ce qui renforcerait l'hypothèse de la relation des péricytes, retrouvés à proximité des vaisseaux sanguins et des capillaires, avec l'activité de régénération tissulaire (35,66).

3.2.1.2.2. Le récepteur trans-membranaire Notch

Un mécanisme de signaux empreinte le chemin du récepteur Notch, et permet aux cellules adjacentes d'adopter un destin différent. Ce mécanisme de signaux, participent à la cascade moléculaire gouvernant le développement dentaire embryonnaire.

Le récepteur Notch est exprimé par des cellules progénitrices avec un potentiel de différenciation double. Ces cellules sont activées par un ligand spécifique au récepteur Notch et transmis par les cellules voisines. L'interaction ligand récepteur inhibe l'un des deux chemins de différenciation possibles. Ces cellules vont soit rester indifférenciées, soit se différencier selon les signaux en présence. Ces signaux échangés, entre les cellules voisines à travers ce récepteur Notch, influencent la différenciation, la prolifération et l'apoptose (55).

Durant la dentinogenèse primaire Delta1 et Notch ont des expressions complémentaires. Delta 1 est exprimé par les odontoblastes différenciés, alors que Notch reste confiné aux cellules sous-odontoblastiques. Ceci suggère le rôle des signaux Delta et Notch dans le contrôle de la différenciation des odontoblastes (55). L'expression de Notch dans la pulpe suit un gradient de différenciation. Notch et Delta1 sont absents du tissu dentaire adulte.

3.2.1.2.3. Les glycoprotéines N-cadhérine :

Ces glycoprotéines sont exprimées à la surface des odontoblastes des dents permanentes en développement, mais ne sont pas exprimés par les odontoblastes des dents adultes. Ces cadhérines appartiennent à la grande famille des molécules d'adhésion cellulaires (CAMs). Elles sont impliquées dans des processus biologiques, d'adhésion cellulaire, de reconnaissance cellulaire, de contrôle de la division cellulaire, la migration et la différenciation. Le changement dans l'expression des cadhérines dans le tissu dentaire est corrélé avec le processus qui contrôle la prolifération cellulaire et la différenciation (55).

3.2.1.2.4. Les connexines

Les cellules peuvent directement échanger des ions et des petites molécules à travers des chaînes qui interconnectent leur cytoplasme (GAP junctions). Ces chaînes de jonction GAP sont formées à partir d'une grande quantité de protéines membranaires : les connexins qui sont à un certain degré spécifique du type de tissu et de cellules. La connexin 43 (Cx43) est exprimée par les cellules pulpaires et par les odontoblastes en différenciation au cours du développement dentaire (55).

3.2.2. Leur structure et ultrastructure

Les odontoblastes jeunes sont de petites cellules, de forme ovoïde avec un rapport noyau/cytoplasme élevé, un REG rudimentaire et un appareil de Golgi faiblement développé. Les cellules sont en différenciation et préparent leur activité sécrétoire. Elles établissent des jonctions de type GAP entre elles, au niveau de leur corps cellulaire. Une jonction distale complexe se développe entre la pré-dentine et le corps cellulaire de l'odontoblaste (35).

Les odontoblastes sécrétoires sont alignés à la périphérie de la pulpe le long de la surface de dentine en formation.

L'activité des cellules odontoblastiques est préprogrammée. La nature de ces programmes n'est pas claire, l'étude de la dentinogénèse de réparation pourrait aider à déterminer ce programme.

Lors d'une agression dentino-pulpaire limitée provoquant la dégénérescence d'une partie des odontoblastes, les cellules de Höhl peuvent réexprimer certains facteurs de transcriptions tel que le *c-fos*, se différencier en nouveaux odontoblastes et produire la dentine réactionnelle (45, 54).

L'activité sécrétoire des odontoblastes concerne deux parties distinctes de la cellule :

- Le corps cellulaire impliqué dans la synthèse et le contrôle des protéines intra et extra-cellulaires.
- le prolongement odontoblastique par lequel la sécrétion a lieu.

Ce prolongement est constitué d'un tronc principal et de nombreuses branches latérales. Il est limité par une membrane plasmique et contient les composants du cytosquelette de la cellule (35).

La structure filamenteuse du cytosquelette est importante pour l'organisation et la fonction des cellules et des tissus. La Nestine est un filament intermédiaire, le plus souvent relaté comme un neurofilament. Elle est exprimée dans le développement du système nerveux et des muscles. La nestine est exprimée aussi par les odontoblastes et les fibroblastes de la pulpe durant le dentinogénèse. De manière similaire à Delta1, l'expression de Nestine est sous régulée chez les odontoblastes de la dent permanente humaine (35,55).

3.2.3. La dentine primaire et secondaire

La dentine primaire est sécrétée par les odontoblastes. Les autres cellules de la pulpe : les cellules de la bordure sous-odontoblastique et cellules du corps pulpaire jouent un rôle important dans le support de la dentinogénèse, mais ne jouent aucun rôle dans la sécrétion de la dentine primaire.

Après la formation complète de la racine, une sécrétion de dentine secondaire continue de manière beaucoup plus lente. Cette formation de dentine secondaire provoque une réduction de la taille de la chambre pulpaire. Des études indiquent des changements morphologiques au niveau des odontoblastes, avec la diminution de leur activité sécrétoire (21,67,84). En effet, ces études ont montré une diminution de la taille du corps cellulaire et une décroissance du nombre des organelles cellulaires responsables de la synthèse et du comportement sécrétoire de la cellule.

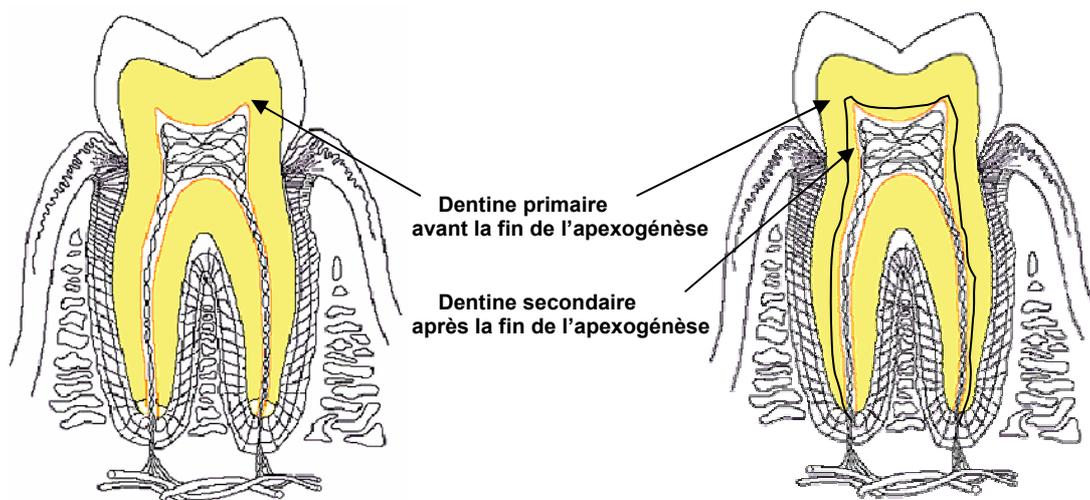


Figure 8 : schéma illustrant la formation de dentine secondaire. (Dr Alliot-Licht)

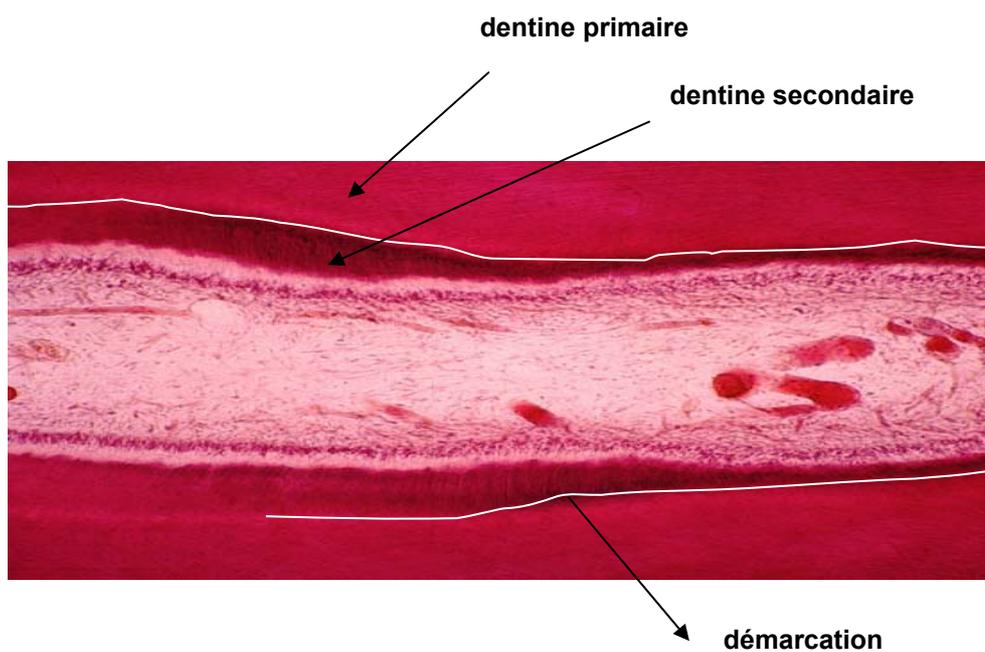


Figure 9 : visualisation de la formation de dentine secondaire au microscope (photo fournie par le département de sciences biologiques Nantes_ Dr Licht)

3.2.4. La dentine réactionnelle

Elle est encore nommée dentine tertiaire, dentine réparatrice ou dentine secondaire irrégulière. Elle exprime un mode de réaction à divers stimuli nocifs. Elle apparaît, par exemple au contact d'une carie ou à la suite de procédés de restauration dentaire (86,87).

La réaction pulpaire est observée comme étant une apposition de dentine entre le site de l'agression et la pulpe dentaire afin de diminuer la perméabilité à ce niveau.

Elle est constituée par des dépôts irréguliers localisés au niveau des odontoblastes préalablement agressés par le stimulus. Lorsqu'elle est secrétée rapidement, elle est creusée de tubules irrégulièrement répartis et emmure souvent quelques odontoblastes. Aussi la dénomme-t-on parfois ostéodentine.

Quand sa sécrétion est plus lente, les tubules y sont plus réguliers et les odontoblastes demeurent à sa périphérie. Ce type de dentine, moins perméable que les dentines primaires et secondaires, aurait un rôle protecteur de la pulpe (86,87) :

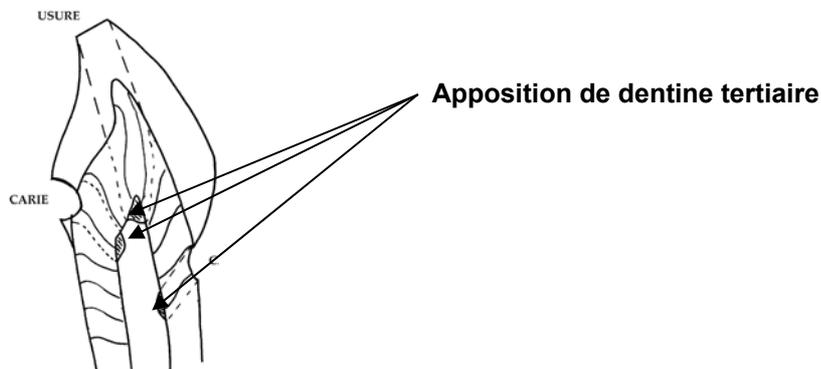


Figure 10 : apposition de dentine tertiaire suite aux différentes agressions pulpaires.(Dr licht)

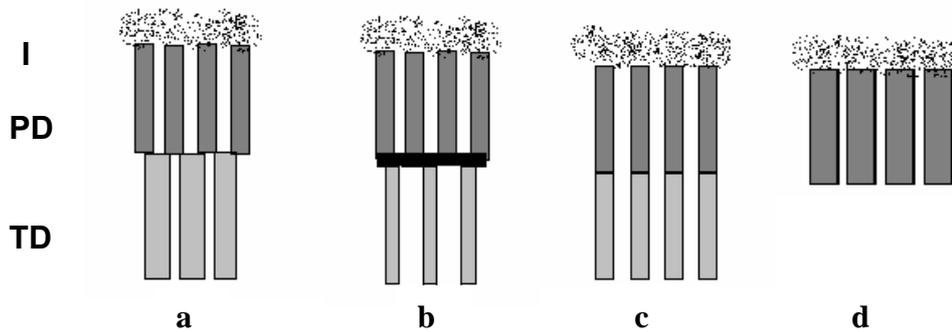


Figure 11 : Différentes structures tubulaires après apposition de dentine tertiaire (TD). (a) discontinuité tubulaire et densité tubulaire inférieure au niveau de la dentine tertiaire. (b) discontinuité tubulaire et apposition d'une ligne de tissu dur atubulaire formée par des cellules *odontoblast-like* faiblement différenciées. (c) continuité tubulaire et maintien de la densité tubulaire. (d) diminution de la perméabilité dentinaire par apposition péritubulaire de dentine sclérotique. I : atteinte dentinaire, PD : dentine primaire. D'après Tziafas et coll. (2000).

3.3. LA DENTINOGENÈSE DE RÉPARATION

Quand l'atteinte est plus sévère, les odontoblastes situés en dessous de la zone agressée peuvent dégénérer. Dans ce cas une nouvelle génération de cellules apparentées aux odontoblastes peuvent se différencier à partir des cellules pulpaire et sécréter une matrice de dentine réparatrice. La matrice sécrétée à partir de cette nouvelle génération de cellules implique une discontinuité au niveau de la structure tubulaire, avec une réduction de la perméabilité dentinaire (55,86,87).

La matrice de dentine de réparation peut être de qualité variable en terme de structure tubulaire. Les propriétés de cette barrière de dentine de réparation vont permettre de diminuer la perméabilité dentinaire et de protéger la vitalité pulpaire.

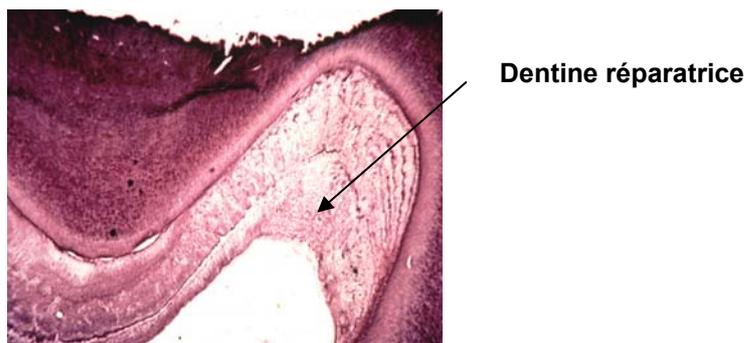


Figure 12 : vue au microscope optique de la formation de dentine réparatrice. (photos fournies par le département de sciences biologiques Nantes_ Dr Licht)

La dentinogenèse de réparation représente un processus plus complexe que l'apposition de dentine réactionnelle. La sécrétion de dentine réparatrice est précédée de la migration et de la différenciation de cellules progénitrices pulpaire (DPSCs) qui vont produire une nouvelle génération d'odontoblastes, appelés *odontoblast-like* (73,86,87).

Durant le développement dentaire, seules les cellules de la papille dentaire dérivées des cellules des crêtes neurales sont capables de répondre spécifiquement aux signaux de différenciation produits par la membrane basale (51,69,70,71). La capacité de chaque type de dents : jeune et adulte, de répondre à une agression en produisant une dentine de réparation, suggère qu'il persiste une population de cellules progénitrices à l'intérieur de la pulpe dentaire. Ces cellules peuvent se différencier en *odontoblast-like*. La question de la nature des précurseurs pouvant donner naissance aux *odontoblast-like* reste à résoudre.

Des études *in vivo* ont permis d'analyser la dentinogenèse de réparation et de valider la persistance de précurseurs, à l'intérieur de la pulpe dentaire, notamment avec l'utilisation d'hydroxyde de calcium comme coiffage pulpaire.

L'hydroxyde de calcium représente le matériau le plus favorable pour la réalisation de coiffages après amputation pulpaire chirurgicale. Depuis les années 1950, on rapporte dans la littérature que quelques semaines après l'application du produit, on observe à l'intérieur de la pulpe la formation d'une matrice minéralisée avec, à sa

base, des cellules allongées polarisées ressemblant à des odontoblastes (44,57,78,83). La formation de cette matrice tubulaire de dentine de réparation requière donc la présence de cellules odontoblastes bien différenciées. La fibrodentine formée avant la matrice tubulaire pourrait être due à un manque de différenciation cellulaire. En effet Tziafas et coll. (2000), émettent l'hypothèse que le phénotype des cellules *odontoblast-like* ne serait acquis que progressivement par les cellules.

La capacité de différenciation des cellules de la pulpe dentaire peut être prouvée par l'expression des récepteurs de membrane, appropriés aux interactions avec les molécules induisant la différenciation cellulaire.

En effet, on retrouve dans la pulpe, des cellules exprimant à leur surface les récepteurs type I et II du TGF- β . Ce facteur de croissance est inducteur de la différenciation des odontoblastes (51,86).

Le phénotype des odontoblastes primaires peut être défini par la morphologie des cellules et de la matrice qu'ils sécrètent. Aussi bien que par le motif de leurs gènes d'expression, conduisant la synthèse et la sécrétion des protéines de la matrice dentinaire. Une partie des cellules *odontoblast-like* peuvent répondre à l'ensemble de ces critères.(35)

Différentes molécules contribuent probablement à la cascade de signaux provoquant la différenciation des *odontoblast-like*.

Les pro-oncogènes nucléaires *c-jun* et *jun-B*, sont connus pour contrôler la transcription via un facteur appelé « activator protein-1 » AP-1, qui est stimulé par des facteurs de croissance tels que BMPs, Tumor Necrosis Factor, Insulin Growth Factor. AP-1 stimule la transcription de l'ostéocalcine, la phosphatase alcaline et les collagènes.

3 à 7 jours après la préparation cavitaire sur une dent, *c-jun* et *jun-B* sont exprimés par les cellules pulpaire sous-jacentes à la cavité. Après 14 jours, ils sont exprimés seulement par les cellules bordant la dentine réparatrice (35).

Le récepteur Notch et le ligand Delta-1 sont exprimés durant la formation dentaire, mais pas par la dent adulte, excepté après un traumatisme. Notch 3 est associé à la

structure vasculaire, alors que Notch 1 est plus souvent retrouvé dans la plupart des cellules pulpairees proches du site du traumatisme (35).

Il faut toutefois encore répondre à une question fondamentale : est-ce que toutes les cellules pulpairees, ou seulement une sous-population spécifique, peuvent répondre aux facteurs exogènes ou endogènes des molécules morphorégulatrices ?

Les *odontoblast-like* peuvent provenir de différentes cellules progénitrices incluant les fibroblastes, les cellules mésenchymateuses indifférenciées de la pulpe dentaire et les péricytes provenant de la vascularisation. On ne comprend pas cependant, comment les cellules adultes peuvent représenter une population de cellules souches.

Il est possible que toutes ces origines pour les cellules progénitrices soient valides et que le terme de cellules *odontoblast-like* a été utilisé de manière plutôt souple pour décrire toute cellule de la pulpe capable de former une matrice minéralisée après une atteinte de la dent (35).

3.4. LES PRÉCURSEURS ODONTOBLASTIQUES

Les précurseurs des ostéoblastes fonctionnels (bone marrow stromal stem cells : BMSSCs) et des odontoblastes (dental pulp stem cells : DPSCs) ont été identifiés initialement par leur capacité à former des amas de colonies cellulaires (colony-forming units fibroblast : (CFU-F) *in vitro* (17,30,39,49,88).

BMSSCs et DPSCs partagent un profil de gènes d'expression similaire pour plusieurs molécules régulatrices de la transcription, pour les protéines de la matrice extra-cellulaire, pour les récepteurs aux facteurs de croissance, pour les molécules d'adhésion, et certaines cellules mais pas toutes pour les marqueurs de la lignée fibroblastique, pour les cellules endothéliales, pour les cellules musculaires lisses et les ostéoblastes (39,74).

Cependant des études précédentes ont rapporté que des colonies de BMSSCs avaient un taux de prolifération différent *in vivo* et *in vitro* (30,48,63). La même

observation a été faite pour les colonies de DPSCs (36). Ensembles, ces études permettent de conclure à une hiérarchisation des cellules souches stromales résidentes dans la moelle osseuse et dans la pulpe dentaire. A leur tête on trouve une population minoritaire de cellules souches multipotentes avec un fort pouvoir de prolifération permettant à une population de cellules progénitrices uni ou bi-potentes de croître.

Gronthos et coll. (2002) ont montré dans leur étude que les cultures primaires de DPSCs expriment des marqueurs associés aux cellules souches neurales : la Nestine et aux cellules gliales : la GFAP (Glial fibrillary acid protein). Ces résultats suggèrent que les DPSCs sont similaires aux autres populations de cellules souches, telles que les BMSSCs, et possèdent une capacité de développement en divers phénotypes. Ils confirment d'autre part que les cellules progénitrices proviennent des crêtes neurales (36).

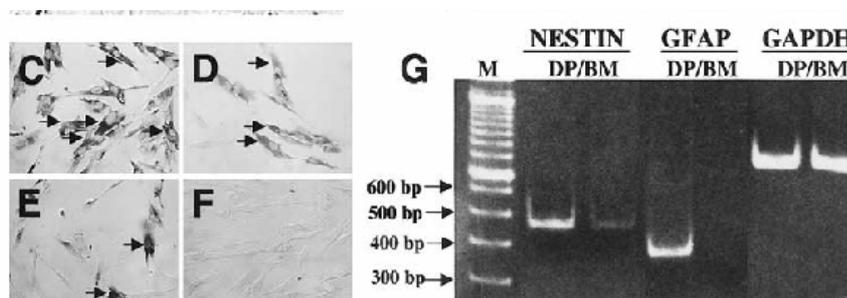


Figure 13 :Différenciation neurale des DPSCs humains. (C) immunocoloration pour la nestine. (D) le GFAP. (E) immunocoloration positive pour la nestine des BMSSCs. (F) coloration négative pour le GFAP des BMSSCs. (G) similarité des résultats obtenus par RT-PCR. Gronthos et coll. 2002

On ne sait pas encore si toutes les colonies de cellules formées à l'intérieur des tissus dérivent d'un pool de cellules souches pluripotentes ou si elles appartiennent à des lignées de progéniteurs distincts. On manque d'information sur la localisation anatomique précise des BMSSCs et des DPSCs dans leur tissu respectif. L'hypothèse a été émise qu'il existe une niche de précurseurs ostéoblastiques et odontoblastiques, qui serait située dans le réseau microvasculaire de la moelle osseuse et de la pulpe dentaire.

3.5. LES PÉRICYTES

3.5.1. Définition

Les péricytes sont aussi connus sous le nom de cellules paravasculaires, cellules murales, myofibroblastes ou cellules de Rouget. Ils sont présents dans la plupart des tissus du corps humain, ils sont situés dans le dédoublement de la membrane basale des capillaires et des veinules post-capillaires et recouvrent les cellules endothéliales. Ils présentent les mêmes caractéristiques que les cellules souches (52).

En effet, en culture, des péricytes isolés à partir de capillaires de rétine de bovins, ont exprimé leur potentiel de différenciation en plusieurs types cellulaires incluant les ostéoblastes, les chondrocytes, les adipocytes et les fibroblastes (13,25,72).

3.5.2. Les marqueurs

3.5.2.1. CD146

Shi et Gronthos (2003) ont utilisé l'anticorps CC9 qui reconnaît l'antigène de surface CD146. Cet antigène est connu pour être présent sur les cellules musculaires lisses, les cellules endothéliales, les myofibroblastes et les cellules de Schwann (77). Il n'est pas exprimé par les cellules souches hématopoïétiques de la moelle osseuse.

Shi et Gronthos montrent dans leur étude de 2003 que la localisation de l'antigène CD146 se situe de manière spécifique au niveau des vaisseaux à l'intérieur de la pulpe dentaire, notamment sur la paroi des péricytes.

3.5.2.2. 3G5

L'anticorps monoclonal 3G5 a été rapporté comme étant un marqueur spécifique des péricytes, il réagit avec un ganglioside : antigène de surface HMW-MAA (High Molecular Weight Melanoma Associated Antigen) (62).

Shi et Gronthos (2003) ont observé que la majorité des DPSCs exprimaient le marqueur des péricytes 3G5. Il existe une différence d'expression du marqueur 3G5

entre les BMSSCs et les DPSCs ceci semble refléter les différentes capacités de régénération de leur tissu respectif. Ces observations peuvent mettre en évidence une ontogénie commune entre les cellules du tissu pulpaire et les péricytes. En effet, on pense que chacun d'eux provient de la migration des cellules des crêtes neurales durant l'embryogénèse (15). A l'inverse, le phénotype des cellules musculaires lisses des BMSSCs (18,23) s'expliquerait par l'origine mésenchymateuse, associée à la pénétration des vaisseaux sanguins dans le canal médullaire de l'os en développement (65).

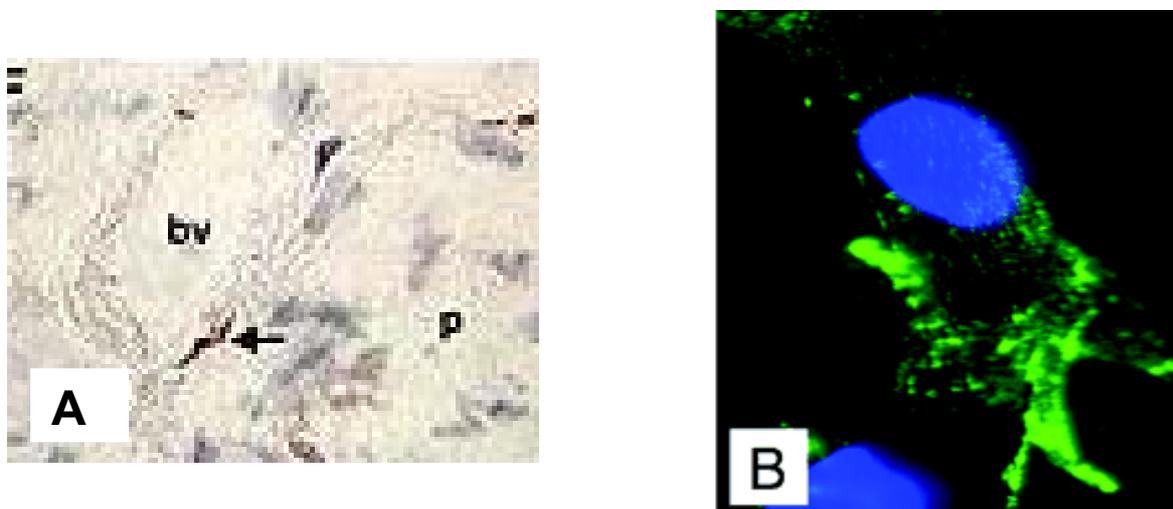


Figure 14 : (A) identification de 3G5 dans le tissu pulpaire Shi et Gronthos 2003. (B) identification de 3G5 à la surface des péricytes Farrington-rock et coll. en 2004.

3.5.2.3. α -SMA

L'alpha actin du muscle lisse est une protéine qui contribue à la contraction des cellules. Doherty et coll. en 1998 ont montré que α -SMA était observée dans les nodules de minéralisation, à chaque étape de la croissance et de la différenciation des péricytes (25).

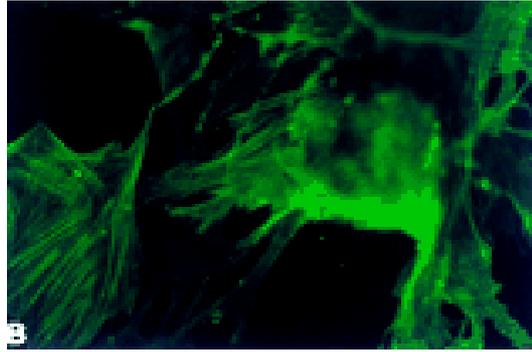


Figure 15 : visualisation de α -SMA dans les nodules de minéralisation formés par les péricytes en culture. Doherty et coll. 1998

Stro-1 est un marqueur des cellules progénitrices mésenchymateuses (confère chapitre sur les marqueurs des cellules mésenchymateuses).

STRO-1 est, d'autre part, détecté sur la paroi des vaisseaux sanguins. Sa colocalisation avec les marqueurs des péricytes CD146 et α -SMA sur la paroi des vaisseaux sanguins, mis en évidence par Shi et Gronthos (2003), implique que les péricytes ont des propriétés de cellules souches.

3.5.3. Les possibilités de différenciation des péricytes

Pour démontrer le potentiel progéniteur des péricytes, il est intéressant de mettre en évidence leur potentiel de différenciation.

Des études ont suggéré que les péricytes pourraient avoir un potentiel de différenciation en ostéoblastes, chondrocytes, adipocytes, cellules musculaires lisses, macrophages et fibroblastes (26,80).

Mais ces suggestions restent indirectes, et les capacités de transformation des péricytes restent encore à élucider (28).

Une étude menée par Farrington-rock et coll. (2004) a montré que sous des conditions de cultures définies, les péricytes peuvent induire l'expression de marqueurs spécifiques aux cellules chondrogéniques et adipogéniques. Une autre étude menée par Doherty et coll. (1998) met en évidence, la capacité de différenciation des péricytes en ostéoblastes.

3.5.3.1. La mise en évidence de la différenciation ostéogénique des péricytes

L'étude de Doherty et coll. (1998), met en évidence la présence de protéines de la matrice osseuse, dans les cultures *in vitro* de péricytes vasculaires. En effet l'analyse par Northern Blot montre la présence des ARNm de l'ostéopontine, l'ostéonectine, la bone sialoprotéine dans les nodules formés par les péricytes en culture. La technique d'hybridation *in situ* confirme et permet de quantifier la présence de l'ARNm de l'ostéocalcine.

Enfin l'analyse par immunomarquage des anticorps spécifiques de chaque protéine montre bien l'expression de ces trois protéines à chaque étape de la croissance et de la différenciation des péricytes.

Les études *in vivo* à l'aide de chambre de diffusion, montre qu'après 28 jours la prolifération des péricytes entraînent la formation d'un tissu fibreux à l'intérieur de la chambre de diffusion. Ce n'est qu'après 56 jours que la chambre de diffusion contient à la fois de l'os, du cartilage et du tissu fibreux (25).

3.5.3.2. La mise en évidence de la différenciation chondrogénique des péricytes

Quand ils sont cultivés dans un milieu contenant 20% de FCS-MEM (sérum de veau fétal), les péricytes prolifèrent et forment des nodules multicellulaires. L'analyse par PCR de l'ARNm des cellules, met en évidence la présence des marqueurs sox9, le collagène type II, et l'aggrécan. Ces marqueurs étant spécifiques des chondrocytes, ceci confirme l'expression de marqueurs chondrocytaires par les péricytes.

La mise en cultures de péricytes, dans un milieu de culture contenant du TGF- β 3 (inducteur de la différenciation chondrogénique) induit leur différenciation en chondrocytes (28).

Dans ces conditions de cultures, les péricytes deviennent plus larges et prolifèrent plus que dans un milieu de culture normal. La coloration des cellules au bleu de toluidine et au bleu alcian met en évidence une matrice extra-cellulaire riche en

protéoglycanes (28). Par immunohistochimie, il est démontré la présence de récepteurs au collagène type I et II .

Par contre les péricytes mis en culture dans un milieu ordinaire, ne présentent pas toutes ces caractéristiques.

La plupart des cellules expriment encore α -SMA et 3G5, ce qui montre que la différenciation ne se fait pas complètement.

Pour confirmer ces informations, des péricytes sont inoculés dans une chambre de diffusion et implantés dans une souris athymique pendant 56 jours.

L'analyse du tissu formé dans la chambre, confirme la présence de cartilage minéralisé formé de lacunes contenant des chondrocytes, ainsi que du fibro-cartilage (28).

3.5.3.3. La mise en évidence de la différenciation adipogénique des péricytes

Des péricytes ont été mis en culture dans un milieu contenant du sérum MEM de lapin pendant 14 jours. La mise en évidence de la différenciation adipogénique se fait par coloration à l'oil red O et par l'examen de l'expression du facteur de transcription PPAR- γ 2 (peroxysome proliferator-activated receptor γ 2) (28).

L'observation des cellules en cultures montre la présence de lipides intra-cellulaires dans une partie des péricytes. Pour confirmer l'identité adipocytaire des péricytes, l'ARNm des cellules est étudié par RT-PCR. Elle met en évidence la présence du facteur PPAR- γ 2.

De même que pour la différenciation chondrogénique, les cellules conservent des récepteurs spécifiques (3G5 et α -SMA) temporairement au cours de la différenciation (28).

Enfin, la mise en place des cellules dans une chambre de diffusion implantées chez une souris athymique, met en évidence la présence de bouquets de cellules dont la morphologie ressemble aux adipocytes (28).

Il a été montré *in vivo* et *in vitro*, la possible différenciation des péricytes en ostéoblastes, chondrocytes, adipocytes. Cependant il reste à déterminer si ces

cellules peuvent aussi se différencier en d'autres types cellulaires, comme les myoblastes ou les cellules neurales (28).

La régulation de cette différenciation reste encore à comprendre.

On peut se demander si au niveau de la pulpe dentaire les cellules qui se différencient, pour former des *odontoblast-like* ne seraient pas des péricytes.

Shi et Gronthos (2003) ont montré que la transplantation de cellules pulpaire CD146 positives dans une souris athymique induisait la formation d'un complexe dentino-pulpaire. Cette observation confirme la nature proche des péricytes et des DPSCs.

4. LES MÉTHODES D'ÉTUDE DES CELLULES SOUCHES PULPAIRES

Les possibilités de réparation et de régénération de l'organe pulpodentinaire ont donc bien été établies. Ces phénomènes permettent de souligner l'existence de précurseurs au sein de la pulpe dentaire. Ces précurseurs ont la capacité de se différencier en *odontoblast-like* et de sécréter la dentine réparatrice en cas d'atteinte dentaire.

4.1. LA CULTURE CELLULAIRE

Bien souvent les troisièmes molaires, n'ayant pas encore fait leur éruption, extraites pour raisons cliniques, chez des patients âgés de 14 à 25 ans, servent de sources de cellules pulpaires.

Les dents sont ouvertes et la pulpe coronaire en est prélevée.

4.1.1. La culture d'explants pulpaires

Dans la technique décrite par Couble et coll. (2000) et par Alliot-licht et coll. (2001) la pulpe est découpée en explants dont la taille ne dépasse pas 1mm³. Ces explants sont mis en culture dans des boîtes de pétris contenant du milieu de culture et supplémenté en antibiotiques et antifongique (pénicilline, streptomycine, amphotéricine B) et en sérum de veau fœtal. Les cultures se font dans une atmosphère humide à 37°C sous 5% de CO₂.

Après 4 à 8 semaines de culture, on obtient la synthèse d'une matrice extracellulaire minéralisée (3,20).

Couple et coll. (2000) mettent en évidence le développement de cellules, dont la morphologie et la synthèse protéique s'apparentent à celles des odontoblastes, à partir de la culture d'explant de cellules pulpaires humaines (20).

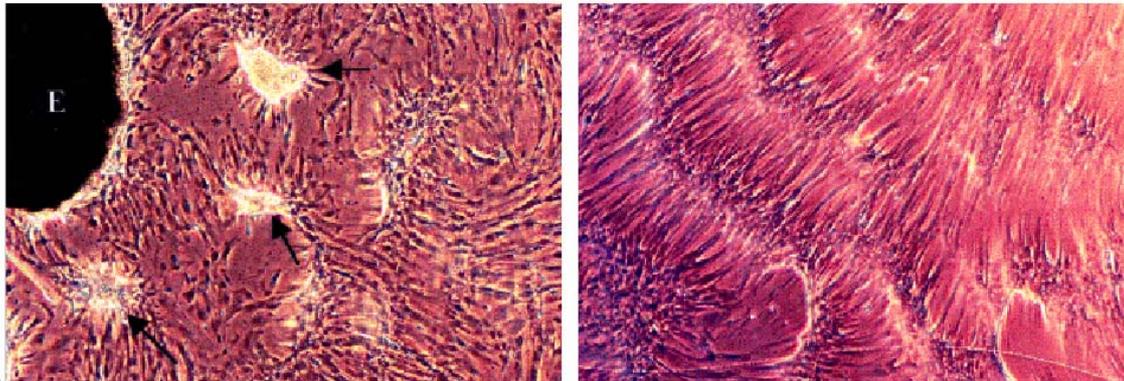


Figure 16 : Morphologie des cellules pulpaire après 20 jours de cultures dans un milieu standard.(A) En primo-culture, on note la formation de nodules cellulaires (flèches=nodules, E=explant). (B) dans les sous-culture organisation des cellules en « collines et vallées ». Grossissement original x40. Alliot-Licht et coll. (2005)

4.1.2. La culture de cellules pulpaire après digestion enzymatique

Dans une autre technique de culture cellulaire, décrite par Gronthos et coll. (2000), la pulpe dentaire est prélevée de la même manière que précédemment : à partir de dents de sagesse extraites pour raisons cliniques, chez des patients de 19 à 29 ans (39).

Le tissu pulpaire est séparé de la couronne et de la racine de la dent. On lui fait subir une digestion enzymatique par une solution de collagénase type I de concentration 3mg /ml et de dispase 4mg/ml. On obtient une solution contenant des cellules indépendantes les unes des autres, une fois filtrée au travers de pores de 70µm de diamètre. Chaque cellule est mise en culture à 37°C sous 5% de CO₂ dans un milieu supplémenté en sérum de veau foetal, acide L-ascorbique 2-phosphate, L-glutamine et par des antibiotiques (pénicilline et streptomycine).

Chaque cellule progénitrice va se multiplier et former une colonie (colony-forming-units-fibroblast, CFU-F). Les cellules composant chaque colonie sont caractérisées par une morphologie typique des fibroblastes.

Après 5 à 6 semaines de mise en culture, en présence d'acide L-ascorbique-2-phosphate, de glucocorticoïde, de dexaméthasone et de phosphate inorganique, les colonies ont la capacité de former des nodules condensés, calcifiés réagissant de manière positive au rouge Alizarin (ce qui confirme la formation d'une matrice minéralisée) (39).

Quelque soit le système de culture *in vitro*, il est nécessaire de le compléter en β -glycérophosphate et/ ou en dexaméthasone (2,20,53,56,59,76).

Nous venons de voir que les cellules pulpaire en culture peuvent induire la formation d'une matrice minéralisée. De ces observations on peut émettre l'hypothèse de l'existence de cellules progénitrices au sein de la pulpe dentaire. L'existence de marqueurs de cellules souches au sein de la pulpe dentaire permettrait de confirmer cette hypothèse. Plusieurs méthodes d'investigation des cellules souches sont applicables, afin d'apporter la preuve de leur existence.

4.2. L'IMMUNO-MARQUAGE DU TISSU PULPAIRE

4.2.1. La dent permanente

L'étude immuno-histochimique des DPSCs permet de caractériser cette population cellulaire, à l'aide d'anticorps spécifiques d'antigènes connus et associés à différents phénotypes.

Gronthos et coll. (2000) ont mis en évidence de nombreux marqueurs de surface caractérisant les DPSCs.

Ils ont montré que, les cultures primaires de DPSCs ne réagissent pas avec les marqueurs hématopoïétiques CD14 (monocyte / macrophage), CD45 (antigène commun des leucocytes), CD34 (progéniteur des cellules hématopoïétiques) et d'autres marqueurs tels MyoD (muscle lisse), neurofilament (nerfs), collagène type II (cartilage), peroxisomal proliferator activated receptor gamma II (PPAR γ 2 pour la graisse) (39).

Les DPSCs expriment plusieurs marqueurs associés à l'endothélium [MUC 18 (CD146), Vascular Cell Adhesion Molecule 1 (VCAM1)], avec les muscles lisses (α -SMA), l'os (la phosphatase alcaline, le collagène type I, ostéonectine, ostéopontine et ostéocalcine), les fibroblastes (collagène type III et fibroblast growth factor II : FGF-2).

Les protéines de la matrice osseuse comme la sialoprotéine osseuse sont absentes des cultures de DPSCs, alors qu'elles sont présentes dans les cultures de cellules souches de moelle osseuse (39).

Marqueurs	DPSCs	BMSSCs
CD14	-	-
CD34	-	-
CD44	++	++
CD45	-	-
Integrin β 1	++/+	++
VCAM1	+	++
MyoD	-	-
α -SMA	++/-	++/+
Neurofilament	-	-
MUC-18 (CD146)	++/-	++/+
Collagène I	+	++/+
Collagène II	-	-
Collagène III	++/+	++/+
Ostéocalcine	++/+	+/-
Ostéonectine	++/+	++/+
BSP	-	+/-
Ostéopontine	+/-	+/-
Phosphatase alcaline	++/+	++/+
PPAR γ	-	-
FGF-2	++/+	++ /+

Figure 17: analyse immunohistochimique de DPSCs humain et de BMSSCs in vitro. D'après Gronthos et coll. (2000).

Shi et Gronthos (2003) ont utilisé différents protocoles d'immunosélection pour montrer que les DPSCs peuvent être retrouvées de manière efficace après digestion enzymatique du tissu pulpaire. Ils se sont basés en premier lieu sur l'expression de l'antigène STRO-1. Cet antigène de surface est connu pour être présent sur les précurseurs de différents types de cellules stromales, incluant les fibroblastes, les ostéoblastes, les chondrocytes, les adipocytes, les cellules musculaires lisses de la moelle osseuse adulte et fœtale. STRO-1 est donc un marqueur des précurseurs de différentes populations de cellules souches mésenchymateuses. Shi et Gronthos 2003 montrent dans leur étude que les cellules porteuses de l'antigène de surface STRO-1 représentent environ 6 % de la population totale des cellules pulpaires (75). Ils observent aussi que 96% des cellules STRO positives sont aussi positives pour l'antigène CD146, et que 85% des DPSCs sont α -SMA positifs.

En 2003, Shi et Gronthos ont de nouveau utiliser l'immunomarquage avec l' antigène de surface : STRO-1 pour caractériser les DPSCs. L'immunosélection par Magnetic-activated cell sorting (MACS) a démontré son efficacité pour détecter les cellules avec une forte expression de l'antigène STRO-1(38). Les cellules STRO-1 positives isolées par MACS sont incubées avec un autre anticorps le CC9 qui reconnaît l'antigène CD146 (marqueur spécifique des cellules endothéliales, des péricytes et des cellules des muscles lisses). L'analyse par Fluorescence-activated cell sorting (FACS) met en évidence que les cellules exprimant STRO-1 expriment aussi CD146 (75).

Dans la pulpe dentaire l'immunolocalisation montre que l'expression de STRO-1 se limite à la paroi des vaisseaux sanguins et autour des nerfs. On ne retrouve pas de cellules STRO-1 positives au niveau de la ligne des odontoblastes matures, ni dans la section de tissu fibreux de la pulpe dentaire.

En outre la colocalisation de STRO-1 et de CD146 se situe sur la paroi externe des vaisseaux sanguins, pas au niveau du tissu fibreux pulpaire, ni au niveau de la ligne odontoblastique, ni autour des fibres nerveuses (75).

4.2.2. La dent temporaire

Miura et coll. (2002) ont isolé des cellules souches multipotentes à partir de la pulpe résiduelle d'incisives temporaires exfoliées chez des enfants de 7 à 8 ans. Les cellules pulpaires sont mises en culture après digestion enzymatique dans une solution de collagénase type I 3mg/ml et de dispase 4mg/ml. Ils ont obtenu une suspension de cellules uniques appelées SHED (Stem Cells from Human Exfoliated Deciduous teeth).

L'immunomarquage à l'aide des anticorps anti-STRO-1 et CC9 (reconnaît CD146) est réalisé. Les analyses mettent en évidence la présence des marqueurs STRO-1 et CD146 à la surface des SHEDs. De plus comme pour les DPSCs STRO-1 et CD146 sont localisés autour des vaisseaux sanguins. Ceci implique que les SHEDs peuvent avoir pour origine les cellules périvasculaires (56).

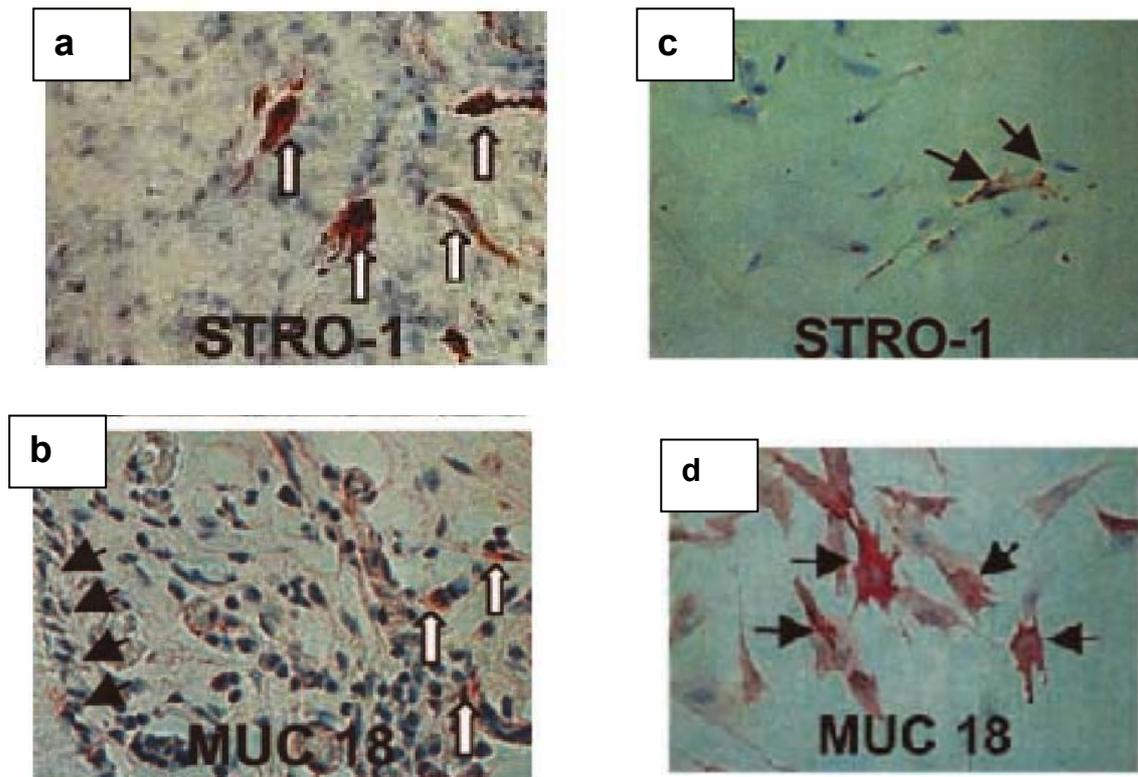


Figure 18 : (a et c) les flèches montrent l'expression de STRO-1 par les SHEDs. (b et d) mise en évidence de l'expression de CD146 (MUC18) par les SHEDs. Miura et coll. 2002

4.3. LA TRANSPLANTATION

Le tissu pulpaire subit une digestion enzymatique, comme précédemment on obtient une suspension de cellules isolées (DPSCs ou de SHEDs) qui sont mises en culture pendant 14 jours. Les clones obtenus sont ensuite transplantés, soit en sous-cutané, soit dans le cerveau de souris immunodéprimées.

4.3.1. Les transplants sous cutanés

4.3.1.1. Le transporteur :HA/TCP

Il a été démontré par Kuznetsov et coll. (1997) que de l'os humain peut être générer après transplantation xénogénique de cellules stromales de la moelle osseuse avec comme transporteur : un mélange d'hydroxyapatite et de phosphate tricalcique

(HA/TCP). L'os ainsi formé subi un renouvellement cellulaire normal, démontré par la présence des ostéoclastes à sa surface (36,48).

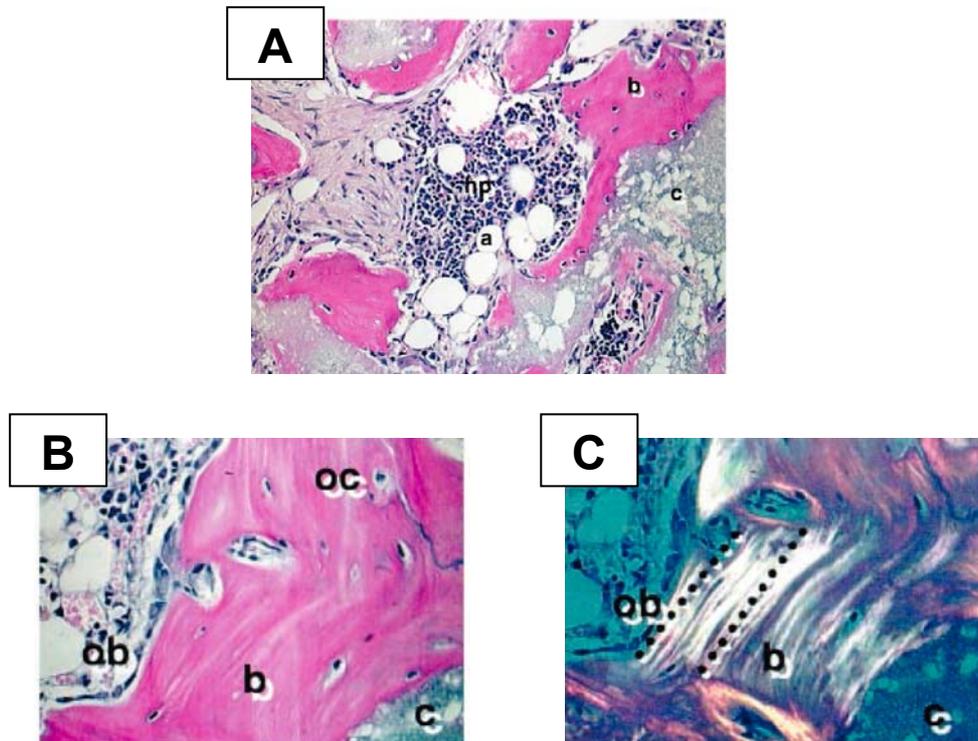


Figure 19 : Potentiel de développement *in vivo* de transplants de BMSSCs (coupes réalisées 6 semaines après la transplantation, coloration hématoxyline et éosine). A : (b) os lamellaire formé à la surface du HA/TCP (c) entourant la moelle hématopoïétique vascularisée (hp), (a) accumulation d'adipocytes. B : vue montrant l'os néoformé contenant les ostéocytes (oc) encastré avec à l'intérieur de la matrice calcifiée et des ostéoblastes (ob) à la limite de la surface osseuse. C : vision des fibres de collagène sous lumière polarisée les dépôts se font parallèlement à la surface formée. (Gronthos et coll. 2000)

De la même manière Gronthos et coll. (2000) ont transplanté des DPSCs chez une souris immunodéprimée avec un mélange de HA/TCP sous forme de poudre. Les DPSCs ont généré une structure s'apparentant à de la dentine à la surface des particules de HA/TCP. Cette ligne de dentine comprend une matrice collagénique organisée déposée de manière perpendiculaire à une ligne d'*odontoblast-like* observées sous lumière polarisée (39).

En 2002 Gronthos et coll. ont prélevé la dentine néoformée après transplantation de DPSCs chez des souris immunodéprimées. 85% de la dentine néoformée réagit avec l'anticorps CD29 spécifique de l'humain. La retransplantation chez une souris

immunodéprimée de ces cellules humaines prélevées, induit leur différenciation en odontoblastes et la formation d'une nouvelle structure pulpodentinaire mature et organisée. En effet, la dentine néoformée réagit positivement à la coloration aux anticorps anti-DSP (Dentin SialoProtein) et contient des fibres de collagènes organisées et disposées perpendiculairement à la surface formée (36).

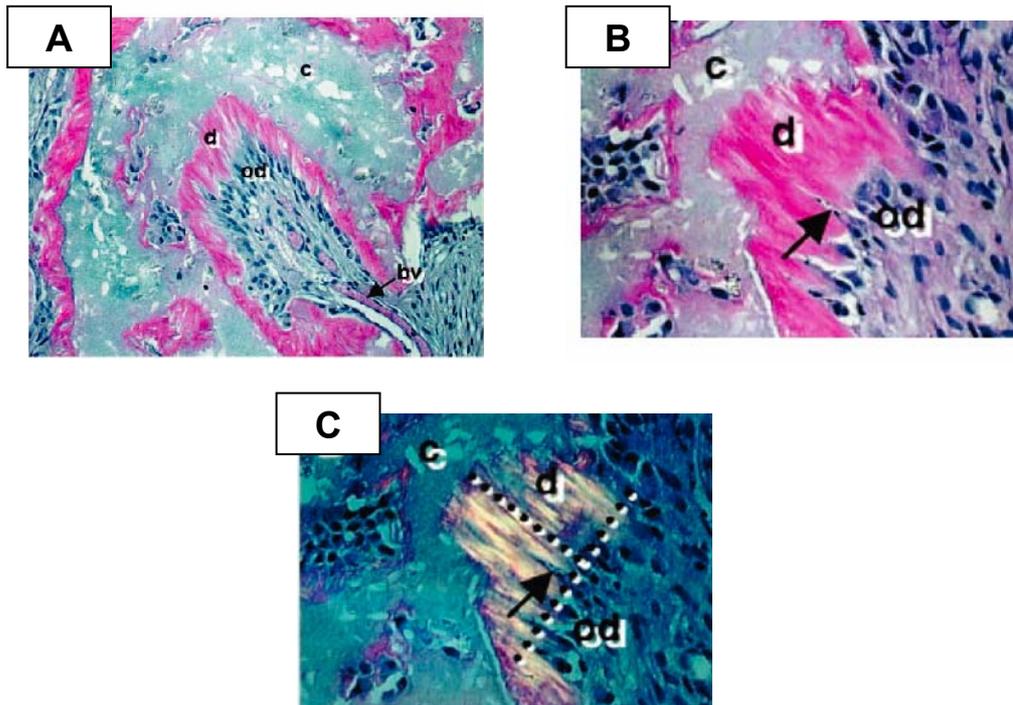


Figure 20 : potentiel de développement in vivo. Photos de coupes de transplants de DPSCs après 6 semaines de transplantation coloration à l'hématoxyline et l'éosine. A : (c) surface de poudre de HA/TCP alignée avec la matrice de dentine (b) entourant la pulpe-like et les vaisseaux sanguins (bv), (od) ligne d'interface avec les cellules odontoblastiques. B : vue de la matrice de dentine (d) ligne d'odontoblast-like (od) la flèche indique un processus odontoblastique. C : la lumière polarisée montre l'alignement perpendiculaire des fibres de collagène de la surface en formation. (Gronthos et coll. 2000)

4.3.1.2. Le transporteur :dentine

Batouli et coll. (2003) ont mis en culture des DPSCs et de la dentine déminéralisée prélevée sur la racine de troisième molaire extraite. Le complexe de DPSCs/dentine est transplanté sous la peau d'une souris immunodéprimée.

Ils ont observé la formation d'une dentine réparatrice directement accolée à la surface de la dentine transplantée (10).

Comme la dentine réparatrice formée dans le complexe dentino-pulpaire humain, cette dentine ne contient pas de structure tubulaire. A l'inverse de la dentine formée *in vivo*, lorsque les DPSCs sont transplantés avec de l' HA/TCP.

La dentine réparatrice formée n'est pas positive la DSP (Dentin Sialo Protein) alors la dentine tubulaire servant d'échafaudage réagit avec l'anticorps anti-DSP. Cette observation confirme la formation d'une dentine réparatrice non tubulaire.

La détection des cellules humaines par immunohistochimie montre que les cellules dentinogéniques à la surface et à l'intérieur de la dentine réparatrice sont bien d'origine humaine (10).

4.3.2. Les transplants dans le cerveau

Miura et coll. (2002) ont injecté dans le cerveau de souris immunodéprimées des SHED (Stem cells from human exfoliated deciduous teeth=cellules souches de dents déciduales humaines) dans le but d'étudier leur potentiel de développement parmi d'autres lignées, telles que les cellules neurales. Pour examiner leur potentiel de différenciation en cellules neurales, ils ont examiné l'expression des marqueurs neuronaux sur la membrane des SHEDs. Il a été montré par immunohistochimie ou par analyse par Western Blot que les SHEDs expriment une grande variété de marqueurs de cellules neurales tels que :

- β III-tubuline (beta 3 tubuline)
- GAD (generalized anxiety disorder)
- NeuN (Neuronal Nuclei)
- GFAP (Glial Fibrillary acidic protein)
- NFM (Neurofilament M)
- CNPase (3'-cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase)

Leur potentiel de développement neural est étudié en injectant des SHEDs dans la zone de l'hippocampe du cerveau de souris immunodéprimées. Les analyses mettent en évidence la survie des SHEDs à plus de 10 jours à partir de l'injection par l'agrégation d'anticorps spécifiques des mitochondries humaines, et la continuité de l'expression des marqueurs des cellules neurales tel que le neurofilament M (NFM) (56).

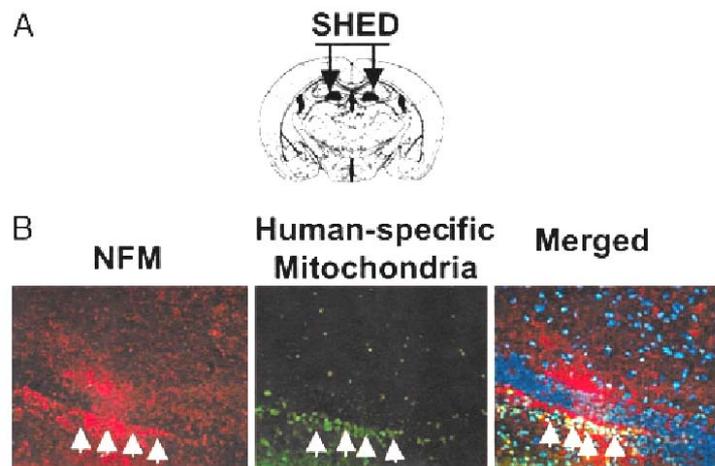


Figure 21 :transplantation de SHED dans le cerveau de souris immunodéprimée. (A) diagramme indiquant l'injection des SHEDs dans la zone de l'hippocampe. (B) avant leur injection les SHEDs sont mis en culture dans un milieu induisant une différenciation neurale. Après 10 jours le cerveau est fixé et préparé pour la coloration par immunofluorescence à l'aide d'anticorps anti-neurofilament M (NFM) et anti-mitochondrie humaine. La photo indiquée par Merged, montre la co-expression de NFM et des mitochondries humaines dans la même zone. Miura and coll. 2002

4.4. LES CULTURES DE DPSCS AVEC DES FACTEURS D'INDUCTION

Les cellules souches de la moelle osseuse ont été définies, par des études *in vivo* et *in vitro*, comme étant des cellules souches pluripotentes adultes (11), car elles possèdent la capacité de se différencier en plusieurs types cellulaires telles que : les ostéoblastes, les chondrocytes les adipocytes, les cellules musculaires et les cellules neurales (7,11,31). En est-il de même pour les DPSCs ?

4.4.1. Le facteur d'induction adipogénique

Après 5 semaines de culture de DPSCs dans un milieu de culture contenant un cocktail adipogénique (isobuthylméthylxanthine, hydrocortisone, indométacine), Gronthos et coll. (2002) ont observés des agglutinations de lipides positif à l' Oil red O. La capacité de différenciation adipocytaire est confirmée par la présence de

PPAR γ 2 (peroxysome proliferator-activated receptor γ 2) et lipoprotéine lipase détectés par RT-PCR (36).

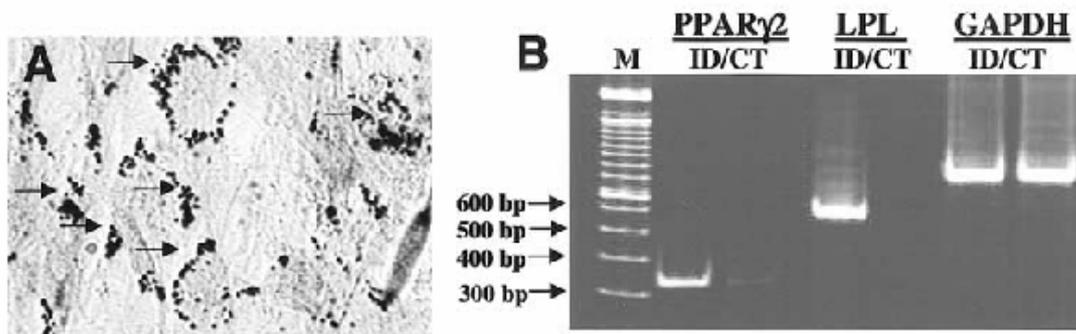


Figure 22 : différenciation adipogénique des DPSCs humains. (A) les DPSCs mis en culture dans un milieu induisant l'adipogénèse, forment des amas de cellules positives Oil red-O. (B) la RT-PCR montre la présence significative de PPAR γ 2 et de LPL des cultures de DPSCs par rapport au contrôle CT. Gronthos et coll. (2002)

4.4.2. Le facteur d'induction odontogénique

Dans l'étude de Yamashita et coll. (2003), des cellules de pulpes dentaires sont mises en cultures dans un milieu contenant de l'acide ascorbique. Deux groupes sont formés, un dans lequel on ajoute de la dexaméthasone, un autre dans lequel on n'en met pas. Après quelques semaines de culture, on étudie la présence de minéralisation par la coloration de Von Kossa et la présence de la phosphatase alcaline. Les deux groupes étudiés sont positifs, ce qui met donc en évidence la présence de minéralisations dans les deux milieux de cultures

On retrouve dans le milieu de culture des ARNm pour la dentine sialophosphoprotéine DSPP qui est un marqueur du phénotype des odontoblastes matures (90).

Yamashita et coll. (2003) montrent que la maturation des odontoblastes est accélérée par la dexaméthasone et qu'elle accroît aussi l'activité phosphatase alcaline et la sécrétion de DSPP (2,90).

Gronthos et coll. (2000) indiquent que BMP-4 (Bone Morphogenetic protein) promeut le développement des odontoblastes en culture en régulant leur prolifération et leur différenciation. En effet, lorsque l'on ajoute des BMP-4 au milieu de culture contenant

des DPSCs ceux-ci se différencient et secrètent de la DSPP. Cette observation confirme le pouvoir de différenciation de la BMP-4.

4.4.3. Le facteur d'induction chondrogénique

Des cellules de pulpe dentaire sont mises en cultures dans un milieu contenant de l'acide ascorbique-2 phosphate et du TGF- β avec ou sans dexaméthasone.

La coloration au bleu de toluidine indique la présence de GAG (glycosaminoglycan sulfatés). La matrice extra cellulaire de ces cellules est positive à la coloration aux anticorps anti-collagène II. Ces marqueurs sont spécifiques des chondrocytes. Ces expérimentations prouvent la capacité de différenciation des DPSCs en chondrocytes à partir d'un milieu de culture spécifique (90).

5. L'UTILISATION DES CELLULES SOUCHES DE LA PULPE DENTAIRE : L'INGÉNIERIE TISSULAIRE

L'ingénierie tissulaire est le nom du procédé utilisé pour restaurer les structures tissulaires de manière fonctionnelle et physiologique après leur destruction par un processus pathologique ou un traumatisme. Les éléments clés de l'ingénierie tissulaire sont : les cellules souches, les morphogènes et l'échafaudage de la matrice extra-cellulaire (91).

5.1. LA RÉPARATION DENTAIRE

Les traitements des lésions carieuses se sont appuyés longtemps sur des notions de mécanique, prenant en considération surtout les propriétés physico-chimiques des matériaux de restauration, en négligeant souvent les conséquences biologiques liées à leur usage. Golberg et coll. (2002) ont mis en évidence l'intérêt des molécules impliquées dans la différenciation cellulaire et dans la formation initiale des tissus minéralisés dans l'émergence des thérapeutiques biologiques dentaires. Les expérimentations menées sur le modèle animal par Goldberg et coll. (2002) mettent à leur disposition plusieurs molécules avec des effets différents sur la pulpe dentaire (34) :

- TGF- β (Tumor Growth Factor β)
- BMP -2,-4 et -7 (Bone Morphogenetic Protein)
- IGF (Insulin Growth Factor)
- OP-1 (Osteogenic protein 1)
- CIA A+4 (Chondrogenic-Inducing Agent forme A+4)
- BSP (Bone Sialo Protein)

Certaines molécules se sont avérées capables d'induire, lorsqu'elles sont placées au contact de zones pulpaires exposées, la formation de dentine réparatrice ou la minéralisation totale de la pulpe dentaire jusqu'au niveau de la racine.

Quelle que soit la molécule étudiée, elles provoquent toutes, le recrutement de cellules encore indifférenciées. Une fois recrutées, les cellules entrent dans la cascade de différenciation. Elles produisent à leur tour une matrice extra-cellulaire qui minéralise ultérieurement.

Des éléments restent encore à déterminer (34) :

- Rechercher l'effet dose dépendante
- Suivre dans le temps les réactions, savoir si les manifestations provoquées restent limitées dans l'espace et le temps ou non.
- Savoir si ces stratégies peuvent s'appliquer aux dents non vitales ou traitées de façon insuffisante.
- Etudier si l'absence de vascularisation et de cellules souches peuvent être compensées par l'ingénierie tissulaire.

5.2. LA RÉGÉNÉRATION PULPAIRE ET DENTINAIRE DANS L'ENDODONTE

Nakashima et coll. (2005) évoquent la possibilité de régénérer tout un complexe dentino-pulpaire après une perte de substance par un traumatisme ou une lésion carieuse.

La formation de ce complexe nécessite l'utilisation de facteurs de croissances et une structure qui permette la fixation des cellules, le relargage des facteurs de croissance et leur transport dans le site à régénérer (60).

Les facteurs de croissance utilisés peuvent être les BMPs (Bone Morphogenetic Protein). En effet, ils jouent un rôle important dans la formation de dentine réparatrice, en cas d'agression pulpaire.

L'échafaudage doit promouvoir la polarisation des cellules et permettre le relargage optimal des facteurs de croissance. Le mélange de HA/TCP peut être utilisé, de même que le MTA (Mineral Trioxyde Aggregat) du fait de sa biocompatibilité et de sa capacité à promouvoir la formation de dentine réparatrice.

En dépit des nombreuses avancées en ingénierie tissulaire, la régénération de la pulpe dentaire nécessite toujours de relever de nombreux défis. En effet, la régénération pulpaire nécessite non seulement de régénérer la dentine, mais aussi la vascularisation et même l'innervation pulpaire.

La complète restauration physiologique des structures et l'intégrité mécanique du complexe dentino-pulpaire est le but ultime du traitement conservateur de la pulpe futur (60).

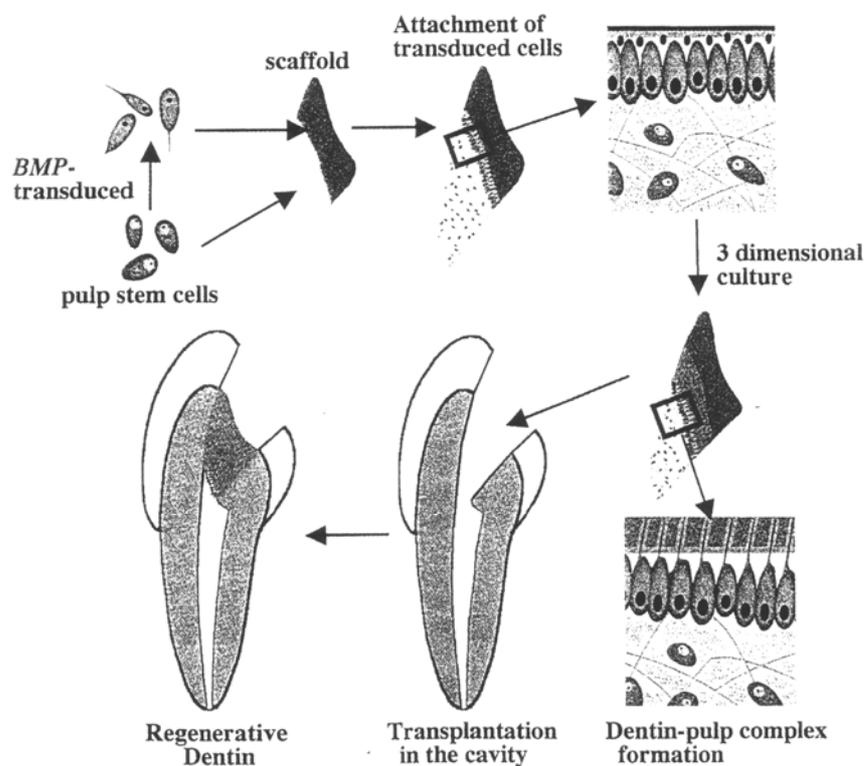


Figure 23 : formation d'un complexe dentino-pulpaire avec application clinique en thérapie de régénération. Les cellules pulpaires sont mises en culture avec des BMPs, liées avec un transporteur pour se différencier en odontoblastes. Le complexe dentine tubulaire et de pulpe est transplanté au niveau de la pulpe amputée dans la dent. D'après Zhang et coll. (2005)

5.3. LA RÉGÉNÉRATION DENTAIRE

Depuis le 18^{ème} siècle des efforts sont fait pour développer des matériaux capables de remplacer l'organe dentaire, et de résister à la dégradation que peut induire le milieu buccal. Cependant, sans l'influence d'une activité masticatoire normale, l'os alvéolaire est rapidement perdu, ainsi que sa capacité à supporter une prothèse dentaire.

Aujourd'hui, le développement des implants dentaires ostéointégrés permet de remplacer les dents manquantes, mais l'interface os implant est différente de celle de la dent, du fait de l'absence de ligament alvéolodentaire. On peut se demander si cette interface pourra supporter les forces masticatoires à très long terme.

Le but de la recherche actuelle serait de développer une dent fonctionnelle.

Les études récentes de Duailibi et coll. (2004) indiquent que les cellules du bourgeon dentaire peuvent se réorganiser et former une « mini dent » (27). D'autres études de Modino et coll. (2005) indiquent que l'épithélium oral combiné avec des cellules appropriées dérivées du mésoderme peuvent aussi former des rudiments dentaires (58). Dans ces études, l'idée est de développer des rudiments de germes dentaires, qui, une fois transplantés dans l'os alvéolaire, pourront entamer un processus de développement et d'éruption normaux pour former une dent.

Une solution intermédiaire peut être envisagée. En premier lieu il est clair que nous ne pouvons pas avoir de dents s'il n'existe pas d'os. L'os alvéolaire adéquat est indispensable pour restaurer une dentition avec une activité masticatoire normale. Il est aujourd'hui possible de constituer un nouvel os alvéolaire à partir des BMSSCs

Gerhon-Robey (2005) propose d'appliquer les techniques de développement des greffes osseuses vascularisées, pour réaliser 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, 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 auteur propose d'utiliser

des cellules de ligament alvéolo-dentaire pour reformer un ciment et un nouveau ligament (33).

En effet Seo et coll. (2004) on mis en évidence la présence de cellules souches multipotentes dans le desmodonte des dents. Ces cellules peuvent si elles sont transplantées *in vivo* produire un nouveau ciment et une nouvelle structure ligamentaire (73).

La présence d'un ciment paraît être indispensable pour l'ancrage du desmodonte et la formation des fibres de Sharpey, ainsi que pour l'absorption des chocs endurés par la dent au cours de la mastication.

6. 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 possible que nous soyons à l'aube de l'utilisation en clinique des cellules souches en odontologie.

Dans ce travail, nous avons exposé les avancées des connaissances sur les cellules souches et leur utilisation en 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 chondrocyte, adipocyte, ostéoblaste. L'identification des cellules souches pulpaires reste cependant à déterminer. L'ingénierie tissulaire ouvre des perspectives nouvelles en endodontie et à quand la régénération complète de l'organe dentaire ?

Références Bibliographiques

- 1. ABE R, DONNELLY SC, PENG T ET COLL.**
Peripheral blood fibrocytes: differentiation pathway and migration to wound sites.
J Immunol 2001;**166**:7556-7562.
- 2. ALLIOT-LICHT B, BLUTEAU G, MAGNE D ET COLL.**
Dexamethasone stimulates differentiation of odontoblast-like cells in human dental pulp cultures.
Cell and Tissue Res 2005;**321**:391-400.
- 3. ALLIOT-LICHT B, HURTEL D ET GREGOIRE M**
Characterization of α -smooth muscle actin positive cells in mineralized human dental pulp cultures.
Archi Oral Biol 2001;**46**:221-228.
- 4. ANDREA C, SINANAN M, NIGEL P ET COLL.**
Human adult craniofacial muscle- derived cells: neural-cell-adhesion-molecule (NCAM; CD56)-expressing cells appear to contain multipotential stem cells.
Biotechnol Appl Biochem 2004;**40**:25-34.
- 5. ANDREOLETTI M, PAGES JC, MAHIEU D, ET COLL.**
Preclinical studies for cell transplantation : isolation of primate fetal hepatocytes, their cryopreservation, and efficient retroviral transduction.
Human gene Ther 1997;**8**:267-274.
- 6. AURIOL MM, LE CHARPENTIER Y ET LE NAOUR G.**
Histologie du complexe pulpodentinaire.
Encycl Méd Chir(Paris), Odontologie, 22007B¹⁰, 2000, **15**.
- 7. AZIZI SA, STROKES D, AUGELLI BJ ET COLL.**
Engraftment and migration of human bone marrow stromal cells implanted in the brains of albino rats-similarities to astrocyt grafts.
Proc Nat Acad Sci USA.1998 **95**: 3908-3913.
- 8. BALLAS F, ZIELSKE SP ET GERSON SL.**
Adult bone marrow stem cells for cell and gene therapies: implications for greater use.
J Cell Biochem 2002;**38**(suppl):20-28.

9. BARRANDON Y, BONFILS F, BREZIN C, ET COLL.

Les cellules souches adultes et leurs potentialités d'utilisation en recherche et en thérapeutique. Comparaison avec les cellules souches embryonnaires. Novembre 2000.

<http://www.recherchegouv.fr/rapport/cellules/cellsouches.pdf>

10. BATOULI S, MIURA M, BRAHIM J ET COLL.

Comparison of Stem-cell-mediated Osteogenesis and Dentinogenesis.
J Dent Res 2003;**82**(12):976-981.

11. BIANCO P, RIMINUCCI M, GRONTHOS S, ET GEHRON ROBEY P.

Bone Marrow Stromal Stem Cells : Nature, Biology, and Potential Applications.
Stem Cells 2001;**19**(3):180-192.

12. BIANCO P ET ROBEY PG.

Stem cells in tissue engineering.
Nature 2001;**414**:118-121.

13. BRIGHTON CT, LORICH DG, KUPCHA R, ET COLL.

The pericyte as a possible osteoblast progenitor cell.
Clin Orthop 1992;**275**:287-299.

14. BRUSTLE O, JONES K, LEARISH R, ET COLL.

Embryonic stem cell derived glial precursors: a source of myelinating transplants.
Science 1999;**285**:754-756.

15. CANFIELD AE ET SCHOR AM.

Osteogenic Potential of vascular pericyte.
In: BERESFORD JN, OWEN ME eds. Marrow Stromal Cells Culture.
Cambridge: Cambridge University Press, 1998;128-148.

16. CASSIDY N, FAHEY M, PRIME SS ET SMITH AJ.

Comparative analysis of transforming growth factor- β isoforms 1-3 in human and rabbit dentine matrices.
Arch Oral Biol 1997;**42**:219-223.

17. CASTRO-MALASPINA H, GAY RE, RESNICK G ET COLL.

Characterization of human bone marrow fibroblast colony forming cells (CFU-F) and their progeny.
Blood 1980;**56**:289-301.

18. CHARBORD P, REMY-MARTIN JP, TAMAYO E ET COLL.

Analysis of the microenvironment necessary for engraftment: Role of the vascular smooth muscle-like stromal cells.
J Hematother Stem Cell Res 2000;**9**:935-943.

19. CLARKE DL, JOHANSSON CB, WILBERTZ J, ETCOLL.

Generalized potential of adult neural stem cells.
Science 2000;**288**:1660-1663.

20. COUBLE M-L, FARGES J-C, BLEICHER F ET COLL.

Odontoblast differentiation of human dental pulp cells in explant cultures.
Calcif Tissue Int 2000;**66**:129-138.

21. COUVE E.

Ultrastructural changes during the life cycle of human odontoblasts. *Archives of Oral Biol*1986;**31**:643-651.

22. DEANS RJ ET MOSELEY AB.

Mesenchymal stem cells : biology and potential clinical uses.
Exp Hematol 2000;**28**(8):875-884.

23. DENNIS J.E ET CHARBORD P.

Origin and Differentiation of Human and Murine Stroma.
Stem Cells 2002;**20**:205-214.

24. DESCHASEAUX F, GINDRAUX F, SAADI R ET COLL.

Direct selection of human bone marrow mesenchymal stem cells using an anti-CD49a antibody reveals their CD48 med, low phenotype.
Br J Haematol 2003;**122**:506-517.

25. DOHERTY M-J, ASHTON BA, WALSH S ET COLL.

Vascular Pericytes Express Osteogenic Potential In Vitro and In Vivo.
Bone Miner Res 1998;**13**:828-838.

26. DOHERTY MJ ET CANFIELD AE

Gene expression during vascular pericyte differentiation.
Crit Rev Eukariot Gene Express 1999;**9**:1-17.

27. DUAILIBI MT, DUAILIBI SE, YOUNG CS ET COLL.

Bioengineering teeth from cultured rat tooth bud cells.
J Dent Res 2004;**83**:523-528

28. FARRINGTON-ROCK C, CROFTS N.J, DOHERTY M.J ET COLL.
Chondrogenic and Adipogenic Potential of Microvascular Pericytes.
Circulation 2004;**110**:2226-2232.

29. FINKELMAN RD, MOHAN S, JENNINGS JC ET COLL.
Quantification of growth factors IGF-I, SGF/IGF-II and TGF-beta in human dentin.
J Bone Mineral Res 1991;**5**:717-723.

30. FRIEDENSTEIN AJ, CHAILAKHYAN RK, LATSINIK NV ET COLL.
Stromal cells responsible for transferring the microenvironment of the hematopoietic tissues. Cloning in vitro a retransplantation in vivo.
Transplantation 1974;**17**:331-340.

31. FUCH E ET SEGRE JA.
Stem Cells: a new lease on life.
Cell 2000;**100**:143-155.

32. GARDNER R.
Contributions of blastocyst micromanipulation of the study of mammalian development.
Bioessays 1998;**20**:168-180.

33. GEHRON ROBEY P
Post natal Stem cells for dental and cranio facial repair
Oral Biosci Med 2005;**2/3**:83-90.

34. GOLDBERG M, SIX N, DECUP F ET COLL.
Minéralisation de la pulpe dentaire : apports de l'ingénierie tissulaire aux thérapeutiques de demain en odontologie.
Pathol Biol 2002;**50**:94-203.

35. GOLDBERG M ET SMITH AJ.
Cells and extracellular matrices of dentin and pulp: A biological basis for repair and tissue engineering.
Crit Rev Oral Biol Med 2004;**15**(1):13-27.

36. GRONTHOS S, BRAHIM J, LI W ET COLL.
Stem cell Properties of Human Dental Pulp Stem Cells.
J Dent Res 2002;**81**(8):531-535.

37. GRONTHOS S, GRAVES S.E, OHTA S ET AND SIMMONS P.J.
The STRO-1⁺ fraction of adult Human bone marrow contains the osteogenic precursors.
Blood 1994; **84**(12):4164-4173.

38. GRONTHOS S, GRAVES SE ET SIMMONS PJ.

Isolation, purification and in vitro manipulation of human bone marrow stromal precursor cells.

IN: BERESFORD JN, OWEN ME eds. Marrow Stromal Cell Culture 1998.

Cambridge university press 1998;26-42.

39. GRONTHOS S, MANKANI M, BRAHIM J ET COLL.

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

Proceed Nat Acad Sci 2000;**97**(25):13625-13630.

40. GRONTHOS S., ZANNETTINO A, GRAVES S ET COLL.

Differential cell surface expression of STRO-1 and Alkaline Phosphatase antigens on discrete developmental stages in primary cultures of human bone cells.

J Bone 1999;**14**:1-47.

41. HÖHL E.

Beitrag zur histologie der pulpa und des dentin (contribution to the histology of pulp and dentin).

Arch Anat Physiol 1896;**32**:31-54.

42. IOHARA K, NAKASHIMA M, ITO M ETCOLL.

Dentin regeneration by dental pulp stem cell therapy with recombinant human bone morphogenetic protein 2.

J Dent Res 2004;**83**(8):590-595.

43. JONTELL M, OKIJI T, DAHLGREN U ET BERGENHOLTZ G.

Immune defense mechanisms of the dental pulp.

Crit Rev Oral Biol Med 1998;**9**:179-200.

44. KARDOS TB, HUNTER AR, HANLIN SM ET KIRK EEJ.

Odontoblast differentiation: a response to environmental calcium?

Endod Dent Traumatol 1998;**14**:105-111.

45. KITAMURA C, KIMURA K, NAKAYAMA T ET TERASHITA M.

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

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

46. KOLOSSOV E, FLEISCHMANN B, LIU Q, ET COLL.

Functional characteristics of ES cell-derived cardiac precursor cells identified by tissue-specific expression of the green fluorescent protein.

J Cell Biol 1998;**143**:2045-2056.

47. KREBSBACH PH ET GEHRON ROBEY P.

Dental and skeletal stem cells: potential cellular therapeutics for craniofacial regeneration.

J Dent Educ 2002;**66**(6):766-773.

48. KUTZNETSOV SA, KREBSBACH PH, SATOMURA K ET COLL.

Single-colony derived strains of human marrow stromal fibroblasts from bone after transplantation in vivo.

J Bone Miner Res 1997;12:1335-1347.

49. KUTZENOV SA, MANKANI MH, GRONTHOS S ET COLL.

Circulating skeletal stem cells.

J Cell Biol 2001;153:1133-1140.

50. LEE S, LUMELSKY N, STUDER L ET COLL.

Efficient generation of midbrain and hindbrain neurons from mouse embryonic stem cells.

Nat Biotechnol 2000;18:675-679.

51. LESOT H, SMITH AJ, TZIAFAS D ET COLL.

Biologically active molecules and dental tissue repair: a comparative review of reactionary and reparative dentinogenesis with the induction of odontoblast differentiation in vitro.

Cells end Materials 1994;4:199-218.

52. LEVY M.M, JOYNER C.J, VIRDI A.S ET COLL.

Osteoprogenitor Cells of mature human Skeletal Muscle Tissue: An In Vitro Study. Bone 2001;29:317-322.

53. MAGLOIRE H, DUMONT J, GRIMAUD JA, ET COLL.

Degradation of type I collagen fibrils synthesized by human dental pulp cells in explant exposed to actinomyces viscosus. Electron microscope immunotyping Experientia 1981;37:1103-1105.

54. MITSIADIS TA, FRIED K ET GORIDIS C.

Reactivation of Delta-Notch signalling after injury: complementary expression patterns of ligand and receptor in dental pulp.

Exp Cell Res 1999;246:312-318.

55. MITSIADIS TA ET RAHIOTIS C.

Parallels between Tooth Development and Repair: Conserved Molecular Mechanisms following Carious and dental Injury.

J Dent Res 2004;83(12):896-902

56. MIURA M, GRONTHOS S, ZHAO M ET COLL.

SHED: Stem cells from human exfoliated deciduous teeth.

Proceed Nat Acad Sci 2003;100(10):5807-5812.

57. MJOR IA, DAHL E ET COX CF.

Healing of pulp exposures: an ultrastructural study.
J Oral Pathol Med 1991;**20**:996-1001.

58. MODINO SA ET SHARPE PT.

Tissue engineering of teeth using adult stem cells.
Arch Oral Biol 2005;**50**:255-258.

59. NAKASHIMA M.

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

60. NAKASHIMA M ET AKAMINE A.

The application of tissue engineering to regeneration of pulp and dentin in endodontics.
J Endod 2005;**10**:711-718.

61. NARUSE K, URABE K, MUKAIDA T ET COLL.

Spontaneous differentiation of mesenchymal stem cells obtained from fetal rat circulation.
Bone 2004;**35**:850-858.

62. NAYAK RC, BERMAN AB, GEORGE KL ET COLL.

A monoclonal antibody (3G5)-defined ganglioside antigen is expressed on the cell surface of microvascular pericytes.
J Exp Med 1988;**167**:1003-1015.

63. PITTENGER MF, MACKAY AM, BECK SC ET COLL.

Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells.
Science 1999; **284**:143-147.

64. POSITION SUR LES CELLULES SOUCHES EMBRYONNAIRES HUMAINES

http://www.genethique.org/doss_theme/dossiers/cellules_souches/positions.htm

65. RIMINUCCI M ET BIANCO P.

The bone marrow stroma in vivo: Ontogeny, structure, cellular composition and changes in disease.
In : BERESFORD JN, OWEN ME eds. Marrow Stromal Cell Culture.
Cambridge University Press 1998;10-25.

66. ROBERTS-CLARK D ET SMITH AJ.

Angiogenic growth factors in human dentine matrix.
Arch Oral Biol 2000;**45**:1013-1016.

67. ROMAGNOLI P, MANCINI G, GALEOTTI F ET COLL.

The crown odontoblasts of rats molars from primary dentinogenesis to complete eruption.

J Dent Res 1990;**69**:1857-1862.

68. RUCH JV.

Determinisms of odontogenesis.

Cell Biol Rev 1987;**14**:1-86.

69. RUCH JV.

Patterned distribution of differentiating dental cells: facts and hypotheses.

Journal de Biologie Buccale 1990;**18**:91-8.

70. RUCH JV, LESOT H ET BEGUE-KIRN C.

Odontoblast Differentiation.

Int J Dev Biol 1997;**42**:219-23.

71. RUCH JV, LESOT H, KARCHER-DJURICIC V ET COLL.

Facts and hypotheses concerning the control of odontoblast.

Differentiation 1982;**21**:7-12.

72. SCHOR AM, CANFIELD AE, SUTTON AB ET COLL.

Pericyte differentiation.

Clin Orthop 1995;**313**:81-91.

73. SEO B-M, MIURA M, GRONTHOS S ET COLL.

Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament.

Lancet 2004;**364**:149-155.

74. SHI S, GEHRON ROBNEY P ET GRONTHOS S.

Comparison of human dental pulp and bone marrow stromal stem cells by cDNA microarray Analysis.

Bone 2001;**29**(6): 532-539.

75. SHI S ET GRONTHOS S.

Perivascular niche of postnatal mesenchymal stem cells in human bone marrow and dental pulp.

J Bone Miner Res 2003;**18**:696-704.

76. SHIBA H, NAKAMURA S, SHIRAKAWA M ET COLL.

Effects of basic fibroblast growth factor on proliferation, the expression of osteonectin (SPARC) and alkaline phosphatase, and calcification in cultures of human pulp cells.

Dev Biol 1995;**170**:457-466.

77. SHIH IM.

The role of CD146 (Mel-CAM) in biology and pathology.

J Pathol 1999;**189**:4-11.

78. SHRODER U.

Effects of calcium hydroxide-containing agent on pulp cells migration, proliferation and differentiation.

J Dent Res 1982;**64**:541-548.

79. SIMMONS PJ ET TOROK-STORB B.

Identification of stromal cells precursors in human bone marrow by a novel monoclonal antibody, STRO-1.

Blood 1991;**78**:55-59.

80. SIMS DE.

Recent advances in pericytes biology: implications for health and disease.

Can J Cardiol 1991;**7**:431-443.

81. SLOAN AJ, PERRY H, MATTHEWS JB ET SMITH AJ.

Transforming growth factor- β isoform expression in mature human molar teeth.

Histochem 2000;**32**:247-252.

82. SMITH J.R, POCHAMPALLY R, PERRY A ET COLL.

Isolation of a highly clonogenic and multipotential subfraction of adult stem cells from bone marrow stroma.

Stem Cells 2004;**22**:823-831.

83. STANLEY HR.

Criteria for standardizing an increasing credibility of direct pulp capping studies.

Am J Dent 1998;**11**:S17-S34.

84. TAKUMA S ET NAGI N.

Ultrastructure of rats odontoblasts in various stages of their development and maturation.

Arch Oral Biol 1971;**16**:993-1011.

85. TÉCLÈS O, LAURENT P, ZYGOURITSAS S ET COLL.

Activation of human dental pulp progenitor / stem cells in response to odontoblast injury.

Arch Oral Biol 2005;**50**:103-108.

86. TZIAFAS D, BELIBASAKIS G, VEIS A ET PAPADIMITRIOU S.

Dentin Regeneration in Vital Pulp Therapy: Design Principles.

Adv Dent Res 2001;**15**:96-100.

87. TZIAFAS D, SMITH A.J, LESOT H.

Designing new treatment strategies in vital pulp therapy.

J Dent 2000; **28**:77-92.

88. WEISSMAN IL.

Stem cells :units of development, units of regeneration, and units in evolution.
Cell 2000;**100**:157-158.

89. WILES M ET KELLER G.

Multiple hematopoietic lineage develop from embryonic stem (ES) cells in culture.
Development 1991;**111**(2): 259-267.

90. YAMASHITA K, DENNIS J.E, LENNON D.P ET COLL.

Dental pulp cells with multi-potential for differentiation to odontoblast and chondroblast.
J Hard Tissue Biol 2003;**12**(21):49-55.

91. ZHANG W, WALBOOMERS XF, WOLKE JG ET COLL.

Differentiation ability of rat postnatal dental pulp cells in vitro.
Tissue Eng 2005;**11**:357-68.

92. ZIPORI D.

Mesenchymal stem cells: harnessing cell plasticity of tissue and organ repair.
Blood Cells Mol Dis 2004;**33**:211-215.

	N°
<p>RENARD (Emmanuelle).- Les cellules souches et la pulpe dentaire.- 88 f., ill., 30cm.- (these: Chir. Dent.; Nantes; 2005) N°</p>	
<p>L'étude des processus de cicatrisation à l'échelle cellulaire, met en évidence l'importance des cellules souches. Ces cellules assurent le renouvellement de leur pool cellulaire et le turn-over tissulaire. Elles ont la capacité de différencier en plusieurs types cellulaires. L'observation de réparations dentino-pulpaire après un processus pathologique, montre qu'il existe des cellules précurseurs dans la pulpe dentaire. Leur étude se fait par analyse des marqueurs de surface spécifiques. Les cellules souches de la moelle osseuse servent de modèle à ces analyses. Comme pour les cellules souches de la moelle osseuse, l'origine des cellules souches de la pulpe dentaire reste encore inconnue. De fortes similarités de marqueurs de surface avec les péricytes, nous font penser à une origine commune avec ces cellules. L'ingénierie tissulaire permettra peut-être à l'avenir d'utiliser ces cellules souches pour régénérer l'organe dentaire.</p>	
<u>Rubrique de classement :</u>	BIOLOGIE
<u>Domaine Bibliodent :</u>	BIOLOGIE
<p><u>Mots clés :</u> Cellules souches (<i>Stem Cells</i>) - Pulpe dentaire (<i>Dental Pulp</i>) - Régénération (<i>regeneration</i>)</p>	
<p><u>Mots clés Bibliodent :</u> Pulpe dentaire - Cellules souches - Dentine réactionnelle - Régénération</p>	
<p><u>JURY :</u></p> <p>Président : Monsieur le Professeur A.JEAN Asseseurs : Monsieur le Professeur O. LABOUX Madame le Docteur S. DAJEAN Directeur : <u>Madame le Docteur B. ALLIOT-LICHT</u></p>	
<u>Adresse de l'auteur :</u>	RENARD Emmanuelle 33 rue Prefet Bonnefoy 44000 NANTES