

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

Année 2020

N° 3633

Les structures organoïdes appliquées à la biologie pulpaire

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

Présentée
et soutenue publiquement par

PÉPIN Marion

Née le 14 / 09 / 1995

Le 15/06/2020 devant le jury ci-dessous

Président : Madame le Professeur PÉREZ Fabienne

Assesseur : Monsieur le Professeur BADRAN Zahi

Assesseur : Monsieur le Docteur HUGUET Grégoire

Directeur de thèse : Monsieur le Docteur GAUDIN Alexis

UNIVERSITE DE NANTES	
<u>Président</u> Pr LABOUX Olivier	
 <small>UNIVERSITÉ DE NANTES</small>	
FACULTE DE CHIRURGIE DENTAIRE	
<u>Doyen</u> Pr GIUMELLI Bernard	
<u>Assesseurs</u> Dr RENAUDIN Stéphane Pr SOUEIDAN Assem Pr WEISS Pierre	
 <small>Faculté de Chirurgie Dentaire NANTES</small>	
PROFESSEURS DES UNIVERSITES PRATICIENS HOSPITALIERS DES C.S.E.R.D.	
Mme ALLIOT-LICHT Brigitte	M. LESCLOUS Philippe
M. AMOURIQ Yves	Mme PEREZ Fabienne
M. BADRAN Zahi	M. SOUEIDAN Assem
M. GIUMELLI Bernard	M. WEISS Pierre
M. LE GUEHENNEC Laurent	
PROFESSEURS DES UNIVERSITES	
M. BOULER Jean-Michel	
MAITRE DE CONFERENCES DES UNIVERSITES	
Mme VINATIER Claire	
PROFESSEURS EMERITES	
M. JEAN Alain	
ENSEIGNANTS ASSOCIES	
M. GUIHARD Pierre (Professeur Associé)	Mme LOLAH Aoula (Assistant Associé)
MAITRES DE CONFERENCES DES UNIVERSITES PRATICIENS HOSPITALIERS DES C.S.E.R.D.	ASSISTANTS HOSPITALIERS UNIVERSITAIRES DES C.S.E.R.D.
M. AMADOR DEL VALLE Gilles	M. ALLIOT Charles
Mme ARMENGOL Valérie	M. AUBEUX Davy
Mme BLERY Pauline	Mme ARRONDEAU Mathilde
M. BODIC François	Mme BARON Charlotte
Mme CLOITRE Alexandra	Mme BEURAIN-ASQUIER Mathilde
Mme DAJEAN-TRUDAUD Sylvie	M. BOUCHET Xavier
M. DENIS Frédéric	M. FREUCHET Erwan
Mme ENKEL Bénédicte	M. GUIAS Charles
M. GAUDIN Alexis	Mme HASCOET Emilie
M. HOORNAERT Alain	M. HIBON Charles
Mme HOUCHMAND-CUNY Madline	M. HUGUET Grégoire
Mme JORDANA Fabienne	M. KERIBIN Pierre
M. KIMAKHE Saïd	M. OUVRARD Pierre
M. LE BARS Pierre	M. RETHORE Gildas
Mme LOPEZ-CAZAUX Serena	M. SARKISSIAN Louis-Emmanuel
M. NIVET Marc-Henri	M. SERISIER Samuel
M. PRUD'HOMME Tony	
Mme RENARD Emmanuelle	
M. RENAUDIN Stéphane	
Mme ROY Elisabeth	
M. STRUILLOU Xavier	
M. VERNER Christian	
PRATICIENS HOSPITALIERS	
Mme DUPAS Cécile (Praticien Hospitalier)	Mme QUINSAT Victoire (Praticien Hospitalier Attaché)
Mme BRAY Estelle (Praticien Hospitalier Attaché)	Mme RICHARD Catherine (Praticien Hospitalier Attaché)
Mme LEROUXEL Emmanuelle (Praticien Hospitalier Attaché)	Mme HYON Isabelle (Praticien Hospitalier Contractuel)

**Par délibération, en date du 6 décembre 1972, le Conseil de la
Faculté de Chirurgie Dentaire a arrêté que les opinions émises
dans les dissertations qui lui seront présentées doivent être
considérées comme propres à leurs auteurs et qu'il n'entend leur
donner aucune approbation, ni improbation.**

A Madame le Professeur Fabienne PEREZ

Professeur des Universités – Praticien Hospitalier des Centres de Soins d’Enseignement et de Recherche Dentaires

Docteur de l’Université de Toulouse 3

Habilitée à Diriger les Recherches

Chef du département d’Odontologie Conservatrice - Endodontie

Chef du Service d’Odontologie Conservatrice et Pédiatrique

- NANTES -

Pour m’avoir fait l’honneur de présider ce jury,

Pour la qualité de vos enseignements en odontologie conservatrice et endodontie,

Pour l’exigence que vous avez porté à mes travaux et qui m’a permis de toujours progresser,

Je vous exprime mon plus grand respect, ma gratitude et toute ma reconnaissance.

A Monsieur le Docteur Alexis GAUDIN

Maître de Conférences des Universités – Praticien Hospitalier des Centres de Soins
d'Enseignement et de Recherche Dentaires
Docteur de l'Université de Nantes
Ancien Interne des Hôpitaux de Toulouse
Département Odontologie Conservatrice-Endodontie

- NANTES -

*Pour avoir accepté de diriger cette thèse,
Pour être l'initiateur de ce sujet,
Pour votre investissement, votre réactivité et votre écoute tout au long de la rédaction de cette
thèse,
Pour votre pédagogie, vos enseignements et vos conseils tout au long de mon cursus,
Veuillez trouver ici le témoignage de ma sincère reconnaissance.*

A Monsieur le Professeur Zahi BADRAN

Professeur des Universités – Praticien Hospitalier des Centres de Soins d’Enseignement et de
Recherche Dentaires
Docteur de l’Université de Nantes
Habilitation à Diriger les Recherches
Département de Parodontologie

- NANTES -

*Pour m’avoir fait l’honneur et le grand plaisir de siéger au jury de cette thèse,
Pour votre investissement, la qualité de vos enseignements en parodontologie et votre
dynamisme,
Pour votre gentillesse, votre écoute et votre accompagnement tout au long de mon cursus,
Je vous exprime ici mes sincères remerciements et le témoignage de mon amitié.*

A Monsieur le Docteur Grégoire HUGUET

Assistant Hospitalier Universitaire des Centres de Soins d'Enseignement et de Recherche
Dentaires
Département de Chirurgie Orale

- NANTES -

*Pour m'avoir fait l'honneur de siéger dans ce jury,
Pour la qualité de vos enseignements, vos conseils et votre disponibilité tout au long de mon
cursus,
Veuillez trouver ici l'expression de ma reconnaissance et de mes remerciements les plus
sincères.*

TABLE DES MATIÈRES

I. Introduction	11
II. La recherche <i>in vitro</i> en endodontie	13
1) Définition	13
2) Intérêts de la recherche <i>in vitro</i> en Endodontie	16
a. L'étude des mécanismes de la physiologie cellulaire	16
b. Applications pour la médecine régénératrice	16
c. Applications dans l'industrie pharmaceutique	16
d. Autres intérêts	18
3) Limites de la recherche <i>in vitro</i>	19
4) La recherche <i>in vitro</i> appliquée à la biologie pulpaire	22
a. Histologie des tissus et cellules pulpaires	22
b. Étude des réactions pulpaires à des stimuli extérieurs	25
c. Les cellules souches d'origine dentaire	29
III. La recherche <i>in vivo</i> en endodontie	32
1) Définition	32
2) Intérêts	32
3) Limites	34
a. Prédicibilité limitée	34
b. Interprétation des résultats	37
c. L'éthique	37
4) La recherche <i>in vivo</i> appliquée à la biologie pulpaire	40
a. Les modèles ectopiques	40
b. Les modèles orthotopiques	43
c. La part de l'imagerie dans la recherche <i>in vivo</i>	44
IV. Les structures organoïdes en endodontie	46
1) Les structures organoïdes en général	46
2) Les cultures cellulaires en 3 dimensions	48
a. Comparaison 2D/3D	49
b. Domaines d'application	50
c. L'application en biologie pulpaire	52
3) Le modèle expérimental Tooth slice	57
a. Développement du modèle Tooth Slice	57
b. Le modèle Tooth Slice/Scaffold	58
c. Applications du modèle Tooth slice/ Scaffold	59
d. Un modèle en voie de développement	60
4) Les limites des structures organoïdes	62
V. Conclusion	64
VI. Bibliographie	66

TABLE DES FIGURES

Figure 1 : Schéma modélisant l'obtention d'une culture cellulaire primaire puis secondaire ..	14
Figure 2 : Boîtes de Pétri servant à la culture cellulaire par adhésion	14
Figure 3 : Flacons pour les cultures cellulaires par suspension	14
Figure 4 : Courbe de croissance représentant le taux de survie des cellules au bout de 24h, 48h et 72h	17
Figure 5 : Diagrammes présentant la viabilité cellulaire 24h après application de ciment de phosphate de zinc	18
Figure 6 : Schéma du flux de filtration de l'air d'un poste de sécurité microbiologique.....	19
Figure 7 : Hotte à flux laminaire vertical	19
Figure 8: Photographie d'une coupe au microscope photonique de la pulpe dentaire montrant la palissade des odontoblastes (15)	22
Figure 9 : Photographie d'une coupe de fibroblastes observée par microscope confocal et à fluorescence. Les noyaux sont marqués en bleu, les filaments d'actine en rose et la tubuline en vert.....	23
Figure 10 : Photographie d'une coupe transversale des prismes de l'émail au microscope électronique à balayage	24
Figure 11 : Photographie d'une coupe de la structure de l'émail au MET	24
Figure 12 : Photographies de coupes microscopiques au grossissement x400 de la densité de vaisseaux sanguins dans une pulpe inflammatoire (a) et une pulpe saine (b) (22)	25
Figure 13 : Diagramme présentant le taux de viabilité des fibroblastes pour chaque groupe testé (18).....	26
Figure 14 : Diagramme représentant le taux de bactéries mortes selon la localisation canalaire (coronaire, médian ou apical) et la méthode d'irrigation (passive à la seringue SNI ou sonique EDDY)	28
Figure 15 : Schéma représentant la localisation de foyers de cellules souches au niveau dentaire (17)	29
Figure 16 : Anatomie de la papille apicale. (A) Dent de sagesse extraite avec racines au stade de développement. (B) Application d'éosine sur les racines immatures au niveau du diaphragme épithélial de la zone apicale. (C) Microphotographie des cellules souches de la papille apicale (19)	31
Figure 17 : Culture de cellules mammifères effectuée dans un bioréacteur de laboratoire	39
Figure 18 : Photographie d'une souris avec un greffon sous-cutané placé de manière controlatérale au site d'incision. Prescott et al (47)	41
Figure 19 : Photographies de coupes microscopiques à grossissement x1000 du développement de micro vaisseaux dans une souris immunodéficiente. (a) formation de structures tubulaires vides à 5 jours. (b, c, d) Les cellules endothéliales migrent à l'intérieur des tubes autour des jours 5 à 7, afin de le diviser en 2 ou 3 petits vaisseaux. (e,f) 14 jours après l'implantation, des cellules sanguines de la souris sont visibles dans la lumière des micro vaisseaux.....	42
Figure 20 : Préparation endodontique de la racine mésiale de la première molaire chez le rat. Moreira et al, 2016 (29).....	43
Figure 21 : Image radiographique de la canine d'un furet (30)	45
Figure 22 : Photographie par microscope électronique de la culture de neurones en 3D	48

Figure 23 : Effets de la culture en 3D avec une matrice SMG sur la croissance de DPSCs in vitro à 1 et 7 jours.....	49
Figure 24 : Isolement et caractérisation des cellules de la pulpe dentaire (75).....	52
Figure 25 : Interaction de la condensation mésenchymateuse avec les cellules épithéliales. Les analyses immunohistologiques (b-f) montrent une organisation structurée à l'intérieur de la coculture après 4 semaines. (g) La coloration à l'éosine montre une structure épithéliale en cerclage, indiquant la migration des kératinocytes à l'intérieur de la condensation mésenchymateuse. En (h), la coculture est analysée grâce à l'auto-fluorescence. Dans (i), on observe les odontoblastes en vert et les kératinocytes gingivaux en rouges grâce à des marqueurs sous microscopes à fluorescence. (75).....	53
Figure 26 : Microphotographie de la cavité kystique formée grâce aux sphéroïdes en 3D dans une matrice en collagène au bout de 3 jours. On observe une cavité à 3 jours (a) et 5 jours (b) avec une lignée épithéliale et une morphologie similaire aux kystes radiculaires de l'Homme (c). a, b et c, montrent de nombreuses couches de cellules épithéliales.....	55
Figure 27 : Photographie du modèle expérimental d'ingénierie tissulaire tooth slice/ scaffold. (A) une tranche de dent d'1mm d'épaisseur est coupée dans la région cervicale d'une DDS non-cariée et humaine. (B) Tranche de dent après avoir ôté la cavité pulpaire. (C) Insertion d'une matrice PLLA hautement poreuse dans la tranche de dent. (D) Implantation de la tranche de dent de manière sous-cutanée chez une souris immunodéprimée, après ensemencement de DPSCs. (E) 3 semaines après implantation, on observe un tissu vascularisé dans la chambre pulpaire (69).....	58
Figure 28 : Schéma du modèle tooth slice/scaffold utilisé. (B) Tranche de dent ensemencée de cellules souches dentaires et d'une matrice biodégradable. (C) Fort grossissement du modèle expérimental montrant la frontière entre la matrice et la prédentine. (D) Grossissement X100 de la pulpe dentaire formée après 14 jours d'implantation du modèle dans une souris immunodéficiente. (E) Fort grossissement X400 de la pulpe dentaire obtenue par ingénierie tissulaire et encadrée dans (D).....	59
Figure 29 : Photographie microscopique d'une coupe présentant la pulpe dentaire après application de la lampe photopolymérisable pendant 30secondes. Les odontoblastes montrent des dégâts visibles dans la partie supérieure de la coupe. Grossissement x40 .	61
Figure 30 : Microphotographie de la coupe de pulpe témoin. Elle présente une pulpe saine et la morphologie des odontotblastes est normale.....	61

I. Introduction

La biologie pulpaire est une discipline complexe qui s'intéresse aux cellules et tissus constituant la pulpe dentaire. L'étude de la biologie pulpaire comprend l'embryologie, la physiologie et la pathologie de la dent. Elle aspire à une forte connaissance de l'organe dentaire dans le but d'affiner nos thérapeutiques et nos gestes préventifs, afin de conserver la pulpe vivante et saine malgré les agressions subies. La découverte récente de cellules souches adultes au niveau dentaire suscite de grands espoirs de régénération des tissus lésés.

Afin d'approfondir nos connaissances et d'améliorer nos thérapeutiques, il est nécessaire de passer par une phase de recherche fondamentale avant la recherche clinique chez l'Homme.

La recherche *in vitro* est la première étape dans le processus et a lieu en laboratoire. Elle consiste en la mise en culture de cellules afin de les observer et comprendre leur mécanisme physiologique. Les cultures cellulaires constituent le support d'étude de la cytotoxicité et de la génotoxicité de substances pharmaceutiques et de biomatériaux. Toutefois, le biomimétisme de ce modèle expérimental est limité et ne permet pas de prédire les résultats dans le vivant. La recherche *in vitro* nécessite d'être complétée par une phase de recherche *in vivo*.

La recherche *in vivo* a lieu dans le vivant, et commence sur les animaux avant les essais cliniques chez l'Homme. L'expérimentation chez l'animal soulève de nombreuses questions sur la comparabilité des résultats à l'Homme, le modèle-animal parfaitement reproductible n'existant pas. Surtout, elle interroge sur l'éthique des essais. Bien que la recherche chez l'animal soit de plus en plus encadrée par la législation, l'euthanasie d'êtres vivants est de moins en moins acceptée et tolérée par le grand public.

Ces problématiques ont amené les chercheurs à réfléchir à un modèle expérimental plus éthique et plus proche de l'Homme en termes de prédictibilité. Ainsi, les structures organoïdes ont vu le jour afin de reproduire les tissus et organes de l'Homme au laboratoire mais surtout de mimer une ou plusieurs de leurs fonctions. Ces modèles expérimentaux sont des constructions multicellulaires en trois dimensions capables de reproduire à certains niveaux la complexité de la structure d'un organe.

Les avancées dans le développement des structures organoïdes sont impressionnantes et rapides, comme le montre l'augmentation significative de publications scientifiques à leur propos. L'engouement autour de ce modèle expérimental est la raison de ce travail. Il a pour but de décrire l'utilisation des structures organoïdes en endodontie, de mettre en évidence les avantages et les inconvénients ainsi que ses voies d'amélioration.

Cette analyse commencera par traiter la recherche *in vitro* puis *in vivo* et leurs applications dans le domaine de la biologie pulpaire.

II. La recherche in vitro en endodontie

1) Définition

Le terme *in vitro* tire son origine du latin et signifie « dans le verre ». Selon son origine étymologique, la recherche *in vitro* correspond donc aux expériences menées sur des verreries en laboratoire comme des éprouvettes ou des boîtes de Pétri.

D'après le dictionnaire Larousse, l'*in vitro* se dit des réactions chimiques, physiques, immunologiques ou de toutes les expériences et recherches pratiquées au laboratoire, en dehors d'un organisme vivant. La recherche *in vitro* fait opposition à la recherche *in vivo* qui se pratique sur un organisme vivant.

La culture cellulaire consiste à cultiver des cellules dans un milieu reproduisant le plus fidèlement possible les conditions physiologiques dans lesquelles elles se développent dans l'organisme. Le but est de permettre la reproduction de cellules en quantité suffisante pour constituer un matériel expérimental. Les cellules sont fragiles et évoluent dans un milieu stérile dont la température est contrôlée ainsi que le taux d'oxygène et d'humidité de l'air (1).

Pour sélectionner une culture cellulaire, les chercheurs font appel à des banques de cellules de confiance pour s'assurer de leur authenticité. Il faut également vérifier que la culture n'est pas contaminée par la bactérie *Mycoplasma*, ce qui est fréquent et compromet les résultats expérimentaux. Pour une culture de meilleure qualité, il faut la sélectionner avec un faible nombre de repiquage et examiner différents facteurs pour le choix du type cellulaire (2):

- Choix de l'espèce qui fournit les cellules : Les cellules humaines et primates sont soumises à un plus grand nombre de restrictions biologiques que les cellules issues d'autres animaux.
- Caractéristiques fonctionnelles : le choix de la cellule doit permettre de répondre à l'interrogation de l'expérience. Lors de l'étude d'une maladie, il est logique d'utiliser des cellules qui expriment cette pathologie. De même, une étude cytotoxicologique requiert des cellules rénales ou hépatiques car ce sont elles qui métabolisent et éliminent les médicaments dans notre corps. La Cancer Cell Line Encyclopedica regroupe des données et analyses de plus de 1000 cellules, c'est une source d'information importante pour identifier une culture cellulaire avec un biomarqueur spécifique ou qui exprime une protéine particulière.
- Conditions de croissance : il faut vérifier si les cellules se développent en adhérence ou en suspension, leur besoin nutritif et tous les éléments qui garantissent une croissance viable (3).

Les cellules mises en culture peuvent être de différentes origines :

- Des micro-organismes libres (tels que des bactéries ou levures)

- Des cellules de culture primaire, c'est-à-dire des cellules « saines » prélevées d'un organe par biopsie. Ces cellules ont une durée de vie courte en raison de leur capacité de division limitée et offrent un matériel en faible quantité.
- Des cellules de culture secondaire : ce sont des cellules obtenues par repiquage d'une culture primaire. Le repiquage est une opération qui consiste à sélectionner des cellules qui ne peuvent plus proliférer pour les disperser à une plus faible densité dans un nouveau récipient. Si les cellules ne peuvent plus rentrer en division, c'est soit parce qu'elles ont épuisé leur milieu de culture (c'est le cas pour les cellules en suspension), soit qu'elles sont arrivées à confluence et forment un tapis sur toute la surface de la boîte de Pétri (pour les cellules adhérentes).
- Des cellules ayant un nombre de divisions illimité : elles constituent des lignées cellulaires. Ce sont des cellules souches ou des cellules cancéreuses.

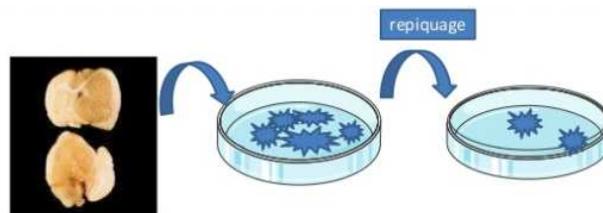


Figure 1 : Schéma modélisant l'obtention d'une culture cellulaire primaire puis secondaire

Afin de reproduire les conditions physiologiques et en fonction des caractéristiques cellulaires, les cellules peuvent être cultivées en adhérence ou en suspension. La culture en suspension est adaptée aux cellules comme les lymphocytes ou les cellules de la moelle osseuse et du sang. Elles sont disséminées dans un flacon contenant un milieu de culture liquide. La multiplication des cellules s'arrête quand un élément du milieu nutritif est épuisé.

La recherche *in vitro* classique est la mise en culture par adhérence, où les cellules sontensemencées dans des boîtes de Pétri contenant un milieu de culture solide. C'est une culture monocellulaire et organisée en monocouche, c'est-à-dire qu'elle n'est constituée que d'une seule sorte de cellules réparties en deux dimensions. Les cellules se développent et se multiplient jusqu'à arriver à confluence et recouvrir la surface entière du support : c'est une croissance inhibée par contact. Le milieu de culture est évalué au préalable pour se rapprocher au maximum des conditions naturelles et obtenir des résultats fiables (4).



Figure 3: Boîtes de Pétri servant à la culture cellulaire par adhésion



Figure 2: Flacons pour les cultures cellulaires par suspension

Les cellules sont placées dans un milieu de culture riche en nutriments et facteurs de croissance. Le milieu de culture apporte les éléments nutritifs nécessaires, contribue au maintien des conditions physico-chimiques (comme le pH et l'osmolarité) et permet la prolifération des cellules. L'objectif des différents milieux de culture est de se rapprocher au maximum des conditions biologiques et physiologiques de l'organisme, ce qui nécessite de contrôler de nombreux paramètres : la température, la pression, le taux d'humidité, le pH et la composition en minéraux et nutriments. En modifiant sa composition, on adapte le milieu de culture à chaque type cellulaire, il existe donc des possibilités illimitées de cultures cellulaires. Certains milieux de culture peuvent être sélectifs ou enrichis, ou au contraire appauvris afin d'orienter la prolifération et différenciation des cellules. Ils peuvent également être en hypoxie, c'est-à-dire que l'apport d'oxygène aux cellules est plus bas que celui retrouvé en conditions physiologiques. Cette technique est très utilisée dans le cadre de recherches sur cellules souches car elle augmente leur taux de prolifération et leur potentiel de différenciation, ainsi que leur viabilité après implantation (5).

La recherche *in vitro* offre de nombreuses variables et facteurs pour étudier les cellules. Ainsi, il est nécessaire de décrire les conditions expérimentales réalisées dans les laboratoires dans les publications scientifiques, ceci afin de pouvoir reproduire expérimentations si nécessaires. La pertinence scientifique des conditions expérimentales est un critère important de la qualité d'une recherche scientifique qui est évalué par exemple lors de l'évaluation d'une publication par les « pairs » (peer review) (6).

Des recherches *in vitro* efficaces doivent être fiables, standardisées et refléter le mécanisme d'action de la substance testée.

2) Intérêts de la recherche *in vitro* en Endodontie

a. L'étude des mécanismes de la physiologie cellulaire

La recherche *in vitro* est indispensable pour constituer les bases de connaissances sur l'organisme. Avant de chercher à soigner ou traiter les différentes pathologies de l'organisme, il faut savoir comment il fonctionne. La recherche *in vitro* a permis d'appréhender la complexité de la physiologie cellulaire et de comprendre les fonctions des cellules, leurs réponses aux stimuli, leur adhérence intercellulaire et à la matrice ainsi que leurs interactions entre elles et à leur environnement par l'intermédiaire de signaux. Les cultures cellulaires ont également mis en évidence les différents mécanismes de différenciation, de prolifération et la mobilité cellulaire (1).

L'avantage de la recherche *in vitro* est l'étendue des variations expérimentales que l'on peut appliquer aux cellules pour tester leurs réponses à différents stimuli. Il est possible de varier à l'infini les milieux de culture pour tester en permanence les réactions cellulaires à de nouveaux facteurs.

b. Applications pour la médecine régénératrice

La recherche *in vitro* permet de réaliser des greffes et autogreffes, notamment en produisant de nouveaux tissus tels que de la peau pour les grands brûlés (7). Des modèles simplifiés d'épiderme ont été développés dès les années 70 (Rheinwald et Green 1975) et permettent l'application topique de crèmes et pommades.

Depuis, il est possible de reconstruire des peaux grâce à des matrices, ce sont des modèles évolutifs qui peuvent être déclinés en peau reconstruite pigmentée, endothélialisée, immunocompétente et adipeuse (4).

La recherche *in vitro* permet également le dépistage de maladies génétiques grâce à un bilan sanguin et la détermination du caryotype de l'individu.

c. Applications dans l'industrie pharmaceutique

Dans le cadre de l'évaluation biologique de nouveaux médicaments, de biomatériaux et dans de nombreuses publications, les chercheurs ont recours à de nombreux tests *in vitro* et *in vivo* afin d'analyser la puissance et les effets d'une substance sur un système vivant.

Ces essais sont souvent réalisés en comparaison avec une substance déjà connue dans le but d'élaborer un médicament ou biomatériau plus approprié et plus efficace. Ils ont pour but de déterminer une dose-efficace du médicament qui reste viable et non toxique pour l'organisme.

Par exemple, l'équipe de Bulbule *et al*, s'est intéressée à la cytotoxicité de *Emblica Officinalis* sur les fibroblastes de la pulpe. Cette baie, également appelée Amla, est utilisée par la médecine traditionnelle Indienne pour ses propriétés anti-inflammatoires, mais son utilisation sur la cicatrisation de la pulpe dentaire n'a jamais été développée.

Les chercheurs ont extrait des fibroblastes issus de la pulpe de dents avulsées et les ont disséminés sur des boîtes de Pétri. Après 4 opérations de repiquage, la culture de cellules secondaire était optimale et les essais cytotoxiques pouvaient commencer. Ils ont appliqué des extraits de *E. Officinalis* ainsi que du MTA directement au contact des cellules pour comparer leurs effets au bout de 48 et 72h. Les résultats montrent une différence significative entre le nombre de cellules survivantes au bout de 72h après application de MTA ou de *E. Officinalis*.

L'équipe de Bulbule conclue que *E. Officinalis* préserve mieux la vitalité des fibroblastes pulpaire que le MTA et qu'il faut continuer les études pour développer le potentiel de cette substance à devenir un médicament de la vitalité pulpaire (8).

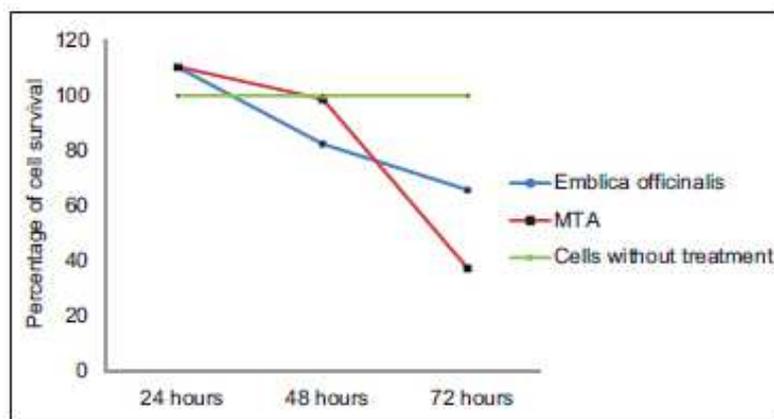


Figure 4 : Courbe de croissance représentant le taux de survie des cellules au bout de 24h, 48h et 72h

De nombreux tests seront nécessaires avant d'envisager la venue de *E. Officinalis* sur le marché des biomatériaux. En effet, la norme ISO 10993-1 :2018 établit des règles pour l'évaluation biologique des dispositifs médicaux au sein d'un processus de gestion du risque et détermine les différents essais. Lors des essais primaires, des tests *in vitro* sont réalisés : les tests cytotoxiques et de génotoxicité. Les essais secondaires testent les irritations, les sensibilisations et les implantations et ont lieu *in vivo* chez l'animal. C'est seulement après le recueil de données *in vitro* et chez l'animal que commencent les essais cliniques chez l'Homme (9).

Les tests cytotoxiques mesurent les changements cellulaires et métaboliques sur les cellules lors de l'application de la substance. Ils détectent les modifications structurales comme la perte de l'intégrité de la membrane cellulaire pouvant aller jusqu'à la mort cellulaire, mais aussi les indicateurs physiologiques et biochimiques de vie cellulaire. Le but est de déterminer la viabilité mais également de vérifier que les cellules arrivent encore à remplir leur fonction suite à l'application de la substance (10).

Par exemple, une étude s'est intéressée à la cytotoxicité de certains matériaux dentaires notamment le ciment à base de phosphate de zinc. Vingt-quatre heures après l'application sur des fibroblastes, les cellules viables étaient comptabilisées. Il y a eu 6 groupes pour tester 6 concentrations différentes (11).

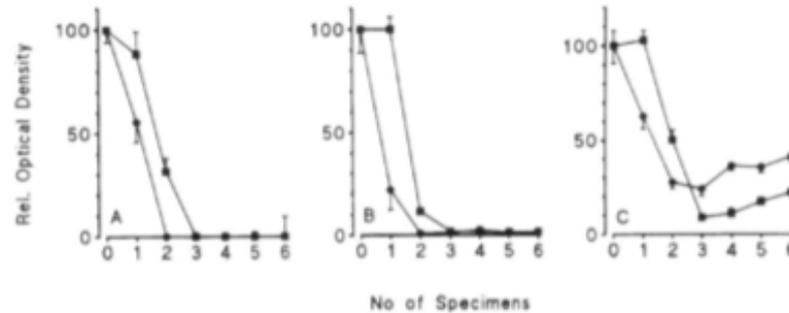


Figure 5 : Diagrammes présentant la viabilité cellulaire 24h après application de ciment de phosphate de zinc

On constate une très faible viabilité des cellules et donc une forte toxicité du ciment à base de phosphate de Zinc sur les cellules dentaires (10).

Les tests de génotoxicité détectent les mutations géniques et chromosomiques potentiellement induits par l'objet de la recherche. L'ensemble de ces tests peuvent être réalisés sur des échantillons de faible volume. Les composés positifs lors de ces tests ont un potentiel cancérigène et de mutation géniques.

d. Autres intérêts

L'intérêt de la recherche *in vitro* se retrouve également dans son coût qui est nettement inférieur à celui de l'expérimentation *in vivo*. De plus, elle est plus simple et plus facile à mettre en place, reproductible et il est aisé de recueillir les résultats et les observations des expérimentations (9).

Enfin, l'expérimentation *in vitro* est moins sujette aux critiques éthiques que la recherche *in vivo*.

3) Limites de la recherche in vitro

L'expérimentation *in vitro* présente néanmoins des limites.

Tout d'abord, la manipulation des cellules requiert une rigueur extrême pour ne pas contaminer les cultures cellulaires et les garder vitales. Le respect des protocoles a un rôle fondamental dans la recherche *in vitro* pour assurer la reproductibilité de l'étude d'une part, et conserver des cellules en parfait état physiologique, d'autre part. Il est donc important de réaliser des contrôles réguliers de stérilité et de vérifier le maintien des caractéristiques cytogénétiques, structurales et fonctionnelles des cellules. Si les cultures cellulaires sont abimées, soit l'expérience ne fonctionnera pas, soit les résultats seront faussés et peu fiables.

Les contaminations peuvent être de différentes origines :

- Biologiques : bactéries, virus, levures ou moisissures
- Chimiques : endotoxines, qualité du plastique, restes de détergent, traces d'aluminium, résidus de désinfectants
- Contamination croisée avec d'autres cellules.

Les cultures cellulaires sont donc très sensibles et les laborantins exercent sous conditions stériles grâce à une hotte à flux laminaire et des postes de sécurité microbiologique (PSM) (4).



Figure 7 : Hotte à flux laminaire verticale

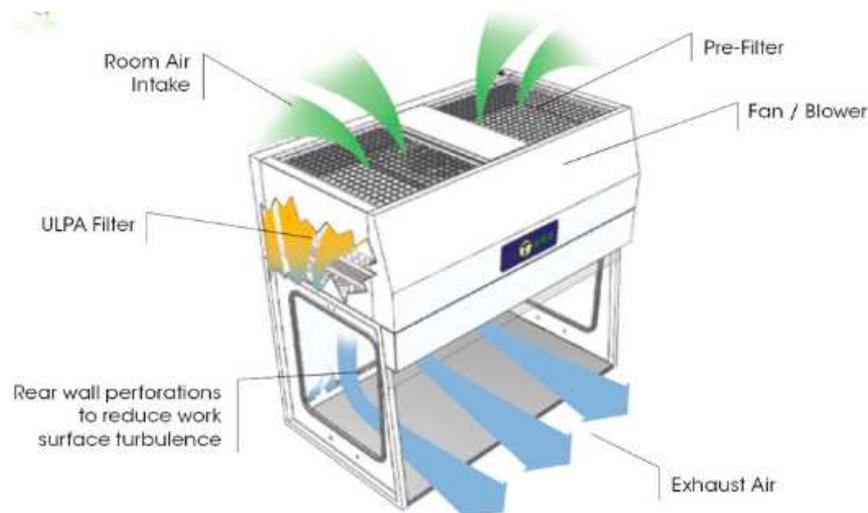


Figure 6 : Schéma du flux de filtration de l'air d'un poste de sécurité microbiologique

De plus, il est difficile de maîtriser la différenciation cellulaire et la prolifération *in vitro*, la durée de vie des cultures cellulaires est limitée. En effet, une cellule normale, saine et dans le corps humain, peut se diviser un certain nombre de fois, que l'on estime entre 50 et 70 fois : c'est la limite de Hayflick (12). Quand la cellule vieillit, elle présente des signes de sénescence. C'est un processus physiologique qui entraîne une dégradation des fonctions cellulaires. Ces modifications phénotypiques sont facilement identifiables et permettent de trier les cellules mises en culture pour conserver seulement celles en bon état. On peut notamment citer une augmentation de la taille cellulaire, de la taille des noyaux et une désensibilisation des cellules aux facteurs de croissance et d'apoptose (13).

Chaque type cellulaire possède sa propre durée de vie mais elle reste néanmoins limitée : les cultures de cellules par adhérence arrêtent leur développement par inhibition de contact et les cellules en suspension finissent leur croissance lorsqu'un élément nutritif n'est plus disponible. Seules les cellules souches et cellules cancéreuses peuvent proliférer indéfiniment. La recherche *in vitro* ne permet donc pas d'évaluer les effets d'une substance sur les cellules au long terme.

Il faut néanmoins rester attentifs à la vitesse de prolifération des cellules qui est souvent plus élevée que celle retrouvée *in vivo*. Or, si la division est plus rapide, la cellule présente un risque plus élevé d'une mutation génétique et de fournir une cellule fille cancéreuse. Une cellule cancéreuse devient immortelle et perd son inhibition de contact. En culture cellulaire, la conséquence est le non-arrêt de la division cellulaire lorsque les cellules arrivent à confluence. Elles vont continuer à proliférer et chevaucher les cellules saines qui vont arrêter de se différencier par inhibition de contact et mourir par asphyxie. L'apparition de cellules cancéreuses conduit donc malheureusement à la mort de la culture cellulaire. Les cellules cancéreuses se reconnaissent à l'observation au microscope grâce à des changements morphologiques du noyau, du cytoplasme et de la membrane (14).

La culture cellulaire permet l'étude séparée de chaque composant physiologique (cellules, matrices, facteurs de croissance) mais ne reflète pas la réalité biologique et n'est pas transposable à la réalité clinique. Dans la structure en deux dimensions des cultures monocellulaires, on perd les composants de la matrice extracellulaire, les interactions entre les cellules et leur matrice ainsi que les interactions intercellulaires, c'est-à-dire entre différents types cellulaires qui cohabitent et fonctionnent ensemble physiologiquement. De plus, les phénomènes de vascularisation et de mobilité sont absents dans la recherche *in vitro* (1).

Ces éléments sont indispensables à la différenciation, prolifération et aux fonctions cellulaires dans le corps humain (1).

Comme vu précédemment, la recherche *in vitro* constitue le principal outil des tests cytotoxique et de génotoxicité lors d'évaluations biologiques de nouveaux médicaments ou biomatériaux. Cependant, ces tests sont réalisés sur les cellules cibles mais ne nous permettent pas de prendre du recul sur les réactions générales de l'organisme de par l'absence des systèmes de circulation : vasculaire, lymphatique et nerveux. Ces différentes voies de communication sont extrêmement importantes dans le corps humain et donnent de nombreuses informations aux cellules, ce qui influence leur réponse.

Pour ces raisons, il est nécessaire de compléter ces recherches par l'étude des réponses physiologiques dans le corps. L'outil le plus utilisé est la recherche *in vivo* chez l'animal.

4) La recherche in vitro appliquée à la biologie pulpaire

La compréhension de la biologie pulpaire nécessite une base de connaissances acquise grâce à la recherche *in vitro*. Cette dernière permet d'étudier les cellules pulpaires ou le complexe dentino-pulpaire dans son ensemble. Il est possible d'envisager de tester différentes réactions pulpaires à des stimuli comme l'application de biomatériaux, médicaments ou différents protocoles. Enfin, la découverte de cellules souches au niveau de la sphère orale crée un intérêt tout particulier à l'étude de leur potentiel.

a. Histologie des tissus et cellules pulpaires

Afin de caractériser les cellules dentaires, les chercheurs ont observé des coupes de dent et de la pulpe dentaire au microscope. Ces coupes permettent de comprendre la composition des tissus dentaires et l'organisation cellulaire. Elles montrent également les cellules nerveuses, les cellules vasculaires et les fibroblastes qui constituent la pulpe dentaire.

Les microscopes utilisés lors de la recherche *in vitro* se distinguent en deux catégories : les microscopes optiques (ou photoniques) et les microscopes électroniques.

Les microscopes photoniques utilisent un rayon de lumière pour grossir l'objet observé. Les images obtenues sont grossies 400 à 2 000 fois. Ce grossissement ne permet pas l'observation de détails mais d'une cellule entière ou structure d'un tissu (15).

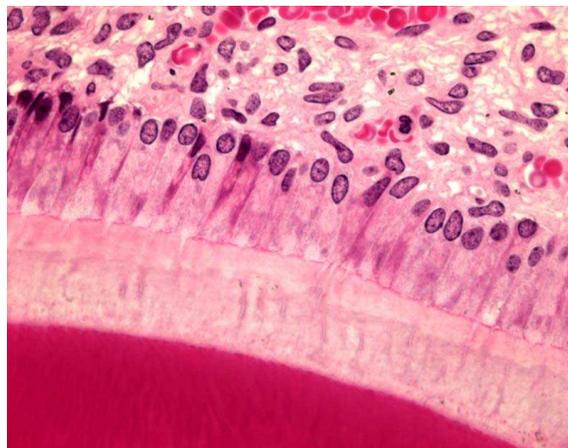


Figure 8: Photographie d'une coupe au microscope photonique de la pulpe dentaire montrant la palissade des odontoblastes (15)

La technique de microscope à fluorescence utilise un émetteur laser qui va exciter une molécule cible dotée de propriétés fluorescente. Les objets observés peuvent émettre de la lumière fluorescente par eux-mêmes (comme la chlorophylle) mais dans le cadre de la biologie pulpaire, il faut les marquer par des substances appelées fluorochromes. L'association la plus courante se fait avec un microscope confocal à balayage laser car il

atteint une résolution bien meilleure que le microscope optique classique et permet de réaliser des images en trois dimensions (16).

En effet, l'inconvénient majeur de la microscopie à fluorescence conventionnelle est la perte de résolution axiale due à la superposition d'informations issues des plans adjacents. Le microscope confocal à balayage laser (MCML) fait partie des microscopes photoniques et pallie ce problème grâce au balayage de la surface observée (17). Il pratique des coupes optiques virtuelles en 2 dimensions de l'objet grâce à un émetteur laser qui pénètre l'échantillon. Ainsi, la reconstitution de l'image entière se fait en 3 dimensions par addition de toutes les coupes et donne une image d'une très bonne netteté. La localisation intracellulaire de chaque signal peut être appréciée avec beaucoup de précision, pour situer des protéines dans une cellule par exemple (18).

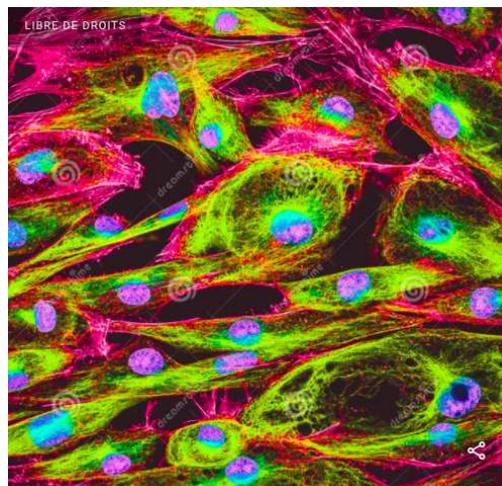


Figure 9: Photographie d'une coupe de fibroblastes observée par microscope confocal et à fluorescence. Les noyaux sont marqués en bleu, les filaments d'actine en rose et la tubuline en vert

En microscopie électronique, les grossissements les plus utilisés vont de 20 000 jusqu'à 100 000. Ici, les électrons remplacent les photons. Les principaux types de microscopes électroniques sont les microscopes électroniques à transmission (MET) et les microscopes électroniques à balayage (MEB).

La microscopie électronique à balayage émet un faisceau d'électrons pour balayer la surface de l'échantillon à analyser et qui réagit en réémettant certaines particules. Ces particules sont analysées par différents détecteurs afin de reconstruire une image en 3 dimensions de la surface (19). La grande profondeur de ce champ est l'atout de ce microscope mais la résolution (1 nanomètre) est moins bonne que celle du microscope électronique à transmission (0,1 nanomètre).



Figure 10 : Photographie d'une coupe transversale des prismes de l'émail au microscope électronique à balayage

Les microscopes électroniques à transmission offrent une résolution très importante qui permet de visualiser des virus ou même des organites intracellulaires. Ils reconstituent une image en 2 dimensions.

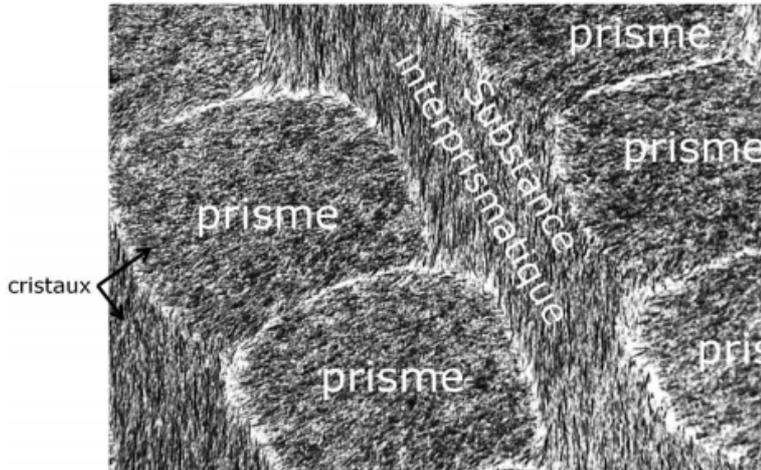


Figure 11 : Photographie d'une coupe de la structure de l'émail au MET

Il est possible de prélever des coupes à différentes localisations de la dent, ainsi, les chercheurs peuvent observer et décrire la composition de la pulpe au niveau caméral, radulaire et apical. Il est également intéressant d'examiner des coupes provenant de plusieurs stades du développement de la dent (20).

Certaines études ont choisi d'observer les tissus et cellules pulpaires dans un état pathologique et non physiologique. C'est le cas des équipes de Bruno et al, 2010, qui se sont questionnés sur la présence de cellules inflammatoires du système immunitaire lors d'une pulpite irréversible. En effet, la réponse inflammatoire consiste en un mécanisme de défense non-spécifique et immédiat impliquant un phénomène vasculo-exudatif comme la vasodilatation et l'augmentation de la perméabilité ainsi qu'une infiltration de cellules inflammatoires tels que les mastocytes, les granulocytes et les cellules dendritiques (21). L'observation de coupes de pulpes avec une importante inflammation en comparaison avec des pulpes présentant une faible inflammation, a révélé d'importantes caractéristiques de l'inflammation d'un point de vue qualitatif et quantitatif, avec une infiltration de cellules inflammatoires et des réactions vasculaires spécifiques (22).

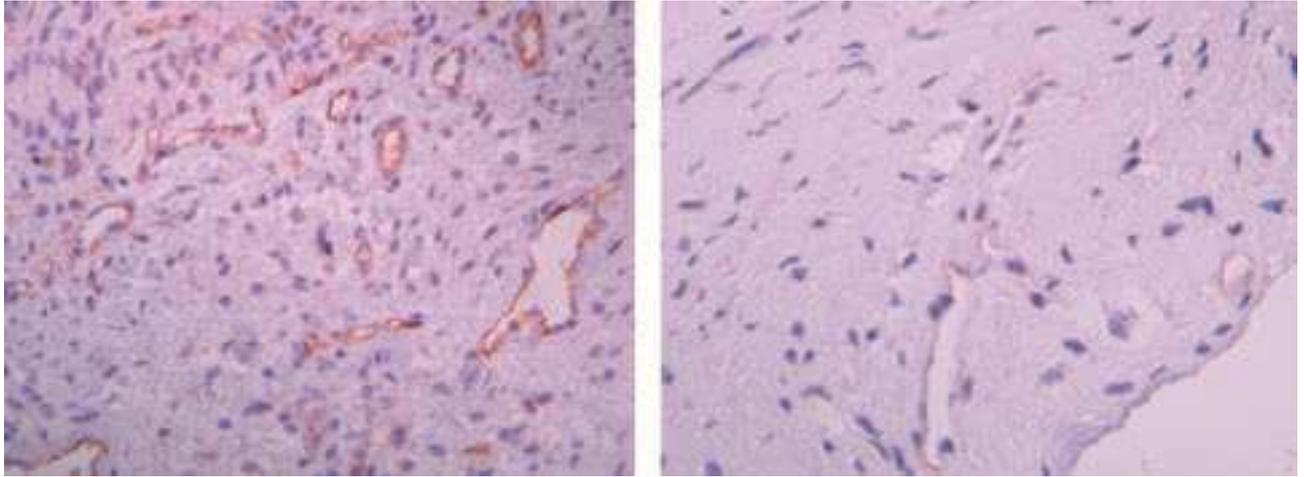


Figure 12 : Photographies de coupes microscopiques au grossissement x400 de la densité de vaisseaux sanguins dans une pulpe inflammatoire (a) et une pulpe saine (b) (22)

Cependant, ces observations microscopiques ne sont pas cliniquement confirmées. La corrélation entre les symptômes et les modifications histopathologiques lors d'une pulpite est faible. De plus, la détermination du type et de l'étendue des changements inflammatoires sur la base des symptômes est imprécise et erronée (23).

Toutes ces études permettent de consolider notre base de connaissances sur les tissus et la pulpe dentaire ainsi que sur les pathologies pulpaire afin de mieux cibler nos traitements et protocoles (22).

b. Étude des réactions pulpaire à des stimuli extérieurs

La pulpe dentaire est soumise à des stimuli extérieurs et traumatismes de différentes natures : bactériens (la carie), physiques (les changements de température), chimiques (application de matériaux et médicaments) et mécaniques (préparation d'une dent et utilisation des rotatifs) (24).

Lors d'une agression, aussi minime soit-elle, la pulpe réagit systématiquement et les odontoblastes stimulés sortent de leur phase quiescente pour sécréter de la dentine tertiaire réactionnelle (24). Il n'est pas possible de décrire une liste exhaustive de tous les stimuli appliqués à la pulpe mais les équipes de chercheurs ont recours à la recherche *in vitro* afin de déterminer les réactions spécifiques de la pulpe, ses changements cellulaires, sa viabilité et sa sécrétion de dentine réactionnelle, lors de l'agression étudiée. Quelques exemples sont détaillés ci-dessous.

- Essais primaires de biomatériaux

Les thérapeutiques de vitalité pulpaire utilisent des matériaux biocompatibles pour protéger la pulpe exposée et stimuler sa réparation par la formation de dentine de réparation. Les matériaux dentaires doivent aider au rétablissement, stimuler la réparation dentinaire, être biologiquement inertes et parfois même bioactifs (25). Le terme « bioactif » renvoie à la capacité du matériau à induire une réponse biologique spécifique de la part des tissus hôtes (26).

Les biomatériaux appliqués sur la dent induisent une réaction cellulaire et tissulaire. Il est nécessaire de s'assurer de leur biocompatibilité grâce aux tests primaires de cytotoxicité et génotoxicité. Ainsi, tous les produits utilisés pour la conservation, la reconstitution et réparation pulpaire, sont étudiés par la recherche *in vitro* avant d'obtenir leur Autorisation de Mise sur le Marché. Le but est de mettre en évidence la réaction pulpaire face à l'application du produit et assurer sa viabilité et réparation (9).

De nouveaux produits sont étudiés afin de rechercher une meilleure efficacité dans les thérapeutiques pulpaires. Une fois les essais primaires validés et leur biocompatibilité prouvée, des études les comparent à un produit gold standard ou à un produit équivalent afin de démontrer leur efficacité ou supériorité.

Par exemple, une étude a comparé les effets cytotoxiques de plusieurs biomatériaux utilisés dans les thérapeutiques de vitalité pulpaire sur les fibroblastes de la pulpe humaine. Ils ont isolé les fibroblastes de la pulpe de dents extraites et les ont cultivés dans des boîtes de Petri. Chaque groupe a reçu l'application d'un biomatériau : Biodentine, Theracal LC, iRoot BP Plus et Angelus MTA, puis le taux de cellules viables a été évalué à 24-, 48- et 72h (27).

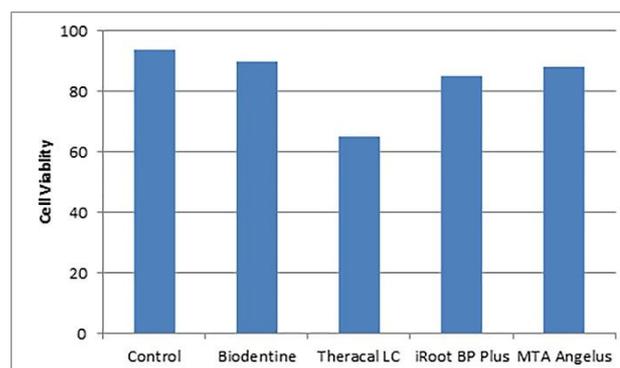


Figure 13 : Diagramme présentant le taux de viabilité des fibroblastes pour chaque groupe testé (18)

Cette étude conclue que ces quatre matériaux peuvent être catégorisé biocompatibles mais prévient sur la cytotoxicité du matériau Theracal LC, à utiliser prudemment.

- Études des effets pharmaceutiques

Les chirurgiens-dentistes sont également amenés à prescrire des médicaments *per os* et, si leur toxicité systémique a été évaluée lors de l'analyse de la molécule avant d'être commercialisée, leurs effets sont parfois inconnus sur la pulpe dentaire. Il est donc important de les tester.

C'est le cas notamment d'une équipe de chercheurs de l'université de Pékin qui a étudié les effets des AINS (anti-inflammatoires non stéroïdiens) sur l'inflammation et la réparation de cellules pulpaires (28). Ils ont utilisé des cultures primaires d'odontoblastes issus de dents de sagesse récemment extraites, puis les ont repiquées 4 à 6 fois avant de les mettre dans un milieu de culture contenant soit de l'aspirine, soit du méloxicam. Au bout de différents intervalles (3, 5 et 7 jours), ils ont mesuré les marqueurs de l'inflammation par PCR afin de déterminer les effets sur les cellules pulpaires (28).

- Études des protocoles de soin

Les chirurgiens-dentistes soignent l'organe dentaire grâce à des protocoles instaurés selon les données acquises de la science. Ces protocoles sont amenés à évoluer en fonction des nouveaux biomatériaux développés et des nouvelles techniques et connaissances. Ils sont donc sans cesse réévalués et comparés pour déterminer le plus efficace et moins traumatique pour pulpe dentaire.

Par exemple, l'irrigation canalaire lors d'un traitement endodontique est essentielle pour éliminer ou au moins réduire la population microbienne à un niveau compatible avec la cicatrisation des tissus péri-apicaux (29). Il s'avère que lors de la distribution d'hypochlorite de sodium grâce à une instrumentation mécanique et passive à l'aide d'une seringue, il reste 38 à 54% de microorganismes dans les canaux (30). L'objectif de l'étude de Zeng et al en 2018, était d'évaluer l'efficacité d'un nouveau système d'irrigation sonore. L'étude a été réalisée *in vitro* sur des prémolaires monoradiculées et extraites de manière intacte. Les chercheurs ont préparé les canaux avant de les diviser en 3 groupes : un groupe témoin (sans irrigation), un groupe avec irrigation à la seringue de manière passive et le dernier avec irrigation active et sonore (système « EDDY ». La même quantité et concentration de NaOCl était distribuée à chaque canal. Ensuite, la quantité de bactéries mortes était comptabilisée au microscope confocal à balayage laser.

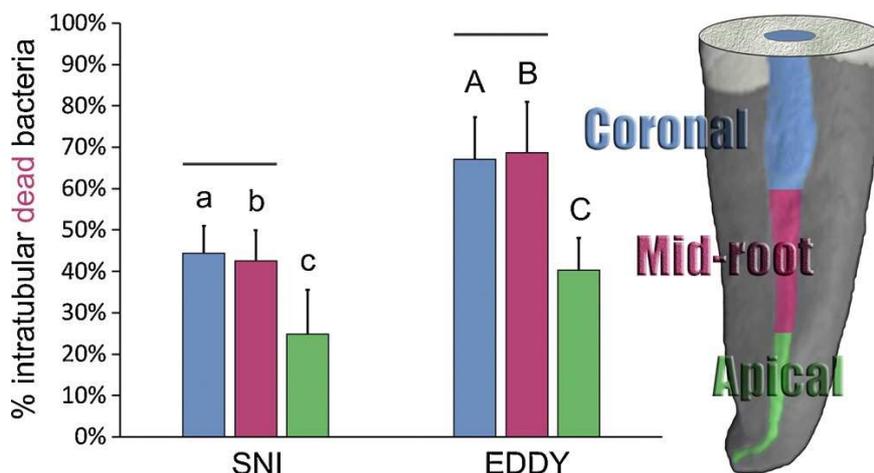


Figure 14 : Diagramme représentant le taux de bactéries mortes selon la localisation canalaire (coronaire, médian ou apical) et la méthode d'irrigation (passive à la seringue SNI ou sonore EDDY)

Les résultats n'ont pas montré de différence significative entre les deux méthodes d'irrigation dans la portion coronaire et médiane du canal. En revanche, il y a plus de bactéries tuées par l'activation sonore dans la partie apicale du canal (31).

Dans ce cas-ci, la recherche *in vitro* permet de comparer l'efficacité d'un produit à une concentration donnée lors de son utilisation avec deux protocoles différents, dans le but de mettre à jour les données acquises de la science.

c. Les cellules souches d'origine dentaire

Les cellules souches sont des cellules qui ont une capacité d'auto-renouveau et de différenciation, sous l'influence de facteurs de croissance spécifiques, en cellules spécifiques pour former des tissus. Les cellules souches adultes sont présentes dans l'organisme, en particulier dans la moelle osseuse et peuvent être de deux types. Les cellules souches hématopoïétiques peuvent se différencier en cellules lignée sanguine (les polynucléaires, les lymphocytes, les macrophages, les cellules dendritiques, les globules rouges et les plaquettes) (32). Ces observations ont déclenché un engouement de la part de la communauté scientifique pour les cellules souches, qui espère pouvoir, un jour, les utiliser à des fins thérapeutiques et permettre la régénération de tissus chez l'Homme.

Les cellules souches mésenchymateuses sont celles qui nous intéressent le plus dans le cadre de la biologie pulpaire car des niches de ces cellules sont retrouvées au niveau dentaire. Ces cellules souches dérivent de la crête neurale et sont multipotentes, c'est-à-dire qu'elles peuvent se différencier en précurseurs des lignées adipocytes, ostéocytes et neurales (33).

De nombreux travaux confirment la présence de cellules souches adultes dans les tissus dentaires (34).

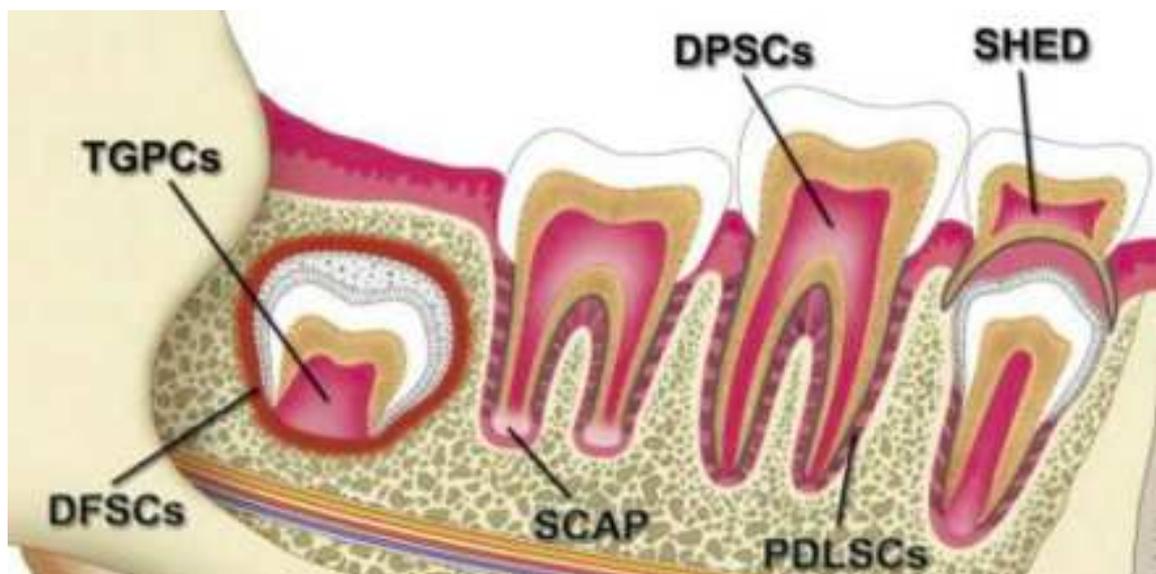


Figure 15 : Schéma représentant la localisation de foyers de cellules souches au niveau dentaire (17)

Il existe différents foyers cellulaires :

- Les cellules souches de la pulpe dentaire (DPSC) : elles se situent dans la pulpe dentaire de la dent adulte
- Les cellules souches de la papille dentaire apicale (SCAP) : elles se retrouvent dans le tissu papillaire dans la partie apicale des racines de dents en voie de développement.
- Les cellules souches du follicule dentaire (DFSC) : elles sont présentes dans le follicule dentaire, un tissu conjonctif lâche qui entoure la dent en cours de développement.
- Les cellules souches des dents déciduales exfoliées (SHED) : elles sont présentes dans la pulpe des dents déciduales et facilement prélevables suite à l'exfoliation de la dent.
- Les cellules souches du ligament alvéolo-dentaire (PDLSC) : elles se situent dans le ligament alvéolo-dentaire.

La recherche *in vitro* permet d'observer leur morphologie, d'identifier les marqueurs spécifiques des cellules souches, d'étudier leur migration, adhésion et différenciation (32).

Par exemple, l'équipe de Ferro et al, a isolé des cellules souches issues de dents de lait (DPSCs) extraites chez des enfants de 9 ans puis les a mises en culture pour étudier leur prolifération, morphologie, marqueurs d'expression de cellules souches et leur potentiel de différenciation (35).

L'équipe de Sonoyama et al, s'est focalisée sur les cellules souches de la papille apicale (SCAPs) et leurs propriétés grâce à des analyses histologiques et immunofluorescence. Après extraction des dents, les chercheurs ont séparé la papille apicale de la racine, isolé et placé en culture les cellules souches de la papille apicale (22).

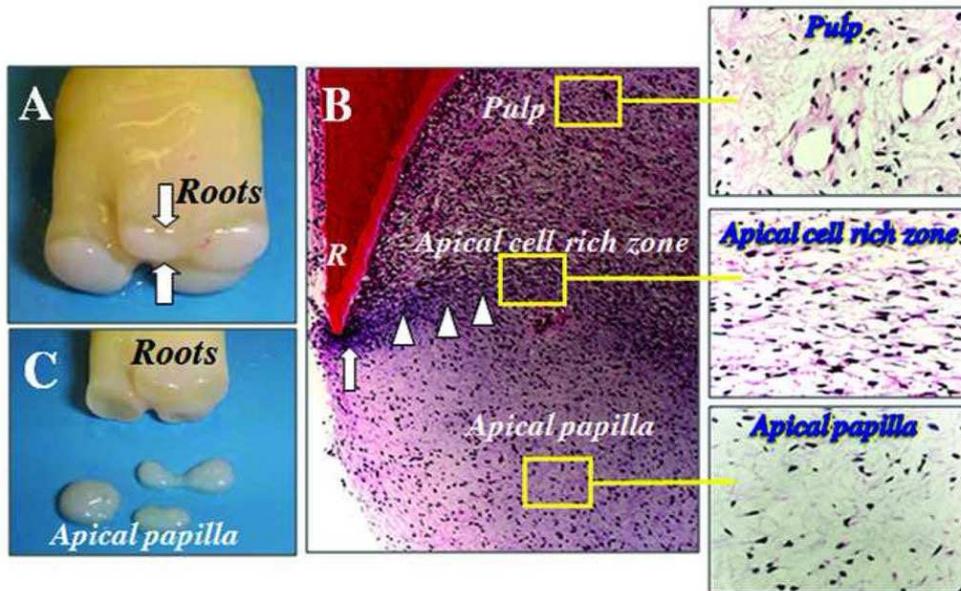


Figure 16: Anatomie de la papille apicale. (A) Dent de sagesse extraite avec racines au stade de développement. (B) Application d'éosine sur les racines immatures au niveau du diaphragme épithélial de la zone apicale. (C) Microphotographie des cellules souches de la papille apicale (19)

Ainsi, l'expérimentation *in vitro* permet de renforcer les connaissances sur la structure et l'architecture des tissus composant la dent mais également sur leurs potentiels. Les cellules souches issues de la pulpe dentaire présentent un grand intérêt pour la régénération de tissu pulpaire, but ultime du clinicien, notamment dans le cadre de thérapeutique de dent immature nécrosée (32). De plus, si les expérimentations sur la régénération pulpaire s'avèrent fructueuses, elles ouvriront la voie à de possibles régénérations de tissu osseux, cartilagineux ou nerveux à partir des cellules souches pulpaires.

En conclusion, la recherche *in vitro* est nécessaire à l'acquisition de nos connaissances et constitue une première étape dans les tests pharmaceutiques et des biomatériaux. Elle ne se substitue pas à la recherche *in vivo*.

III. La recherche in vivo en endodontie

1) Définition

La recherche *in vivo* s'oppose à l'*in vitro* et signifie « dans le vivant » d'après son étymologie latine.

D'après le dictionnaire Larousse, se dit de l'*in vivo* les réactions chimiques, physiques ou interventions pratiquées sur l'être vivant, soit à titre d'expérimentation ou de recherche, soit dans un dessein thérapeutique ou diagnostic.

Afin de créer de nouveaux produits pour la biologie pulpaire, il est indispensable de recueillir des données précises *in vitro* puis *in vivo*. Ces études préliminaires sont indispensables avant les essais cliniques chez l'Homme.

En effet, il est impensable d'un point de vue déontologique et éthique d'évaluer les effets d'une nouvelle substance directement chez l'Homme. Il est donc nécessaire de développer un modèle animal sur lequel les expériences menées puissent être prédictives et reproductives chez l'Homme.

2) Intérêts

La recherche sur des modèles animaux permet d'explorer la diversité des réponses des organismes à leur environnement. Elle facilite aussi la compréhension des pathologies en les analysant selon des angles différents.

Nous parlions précédemment des essais primaires *in vitro* de cytotoxicité et génotoxicité. Après l'interprétation des différents résultats et la détermination d'une dose létale et d'une dose efficace, il est nécessaire de tester les effets sur le vivant grâce aux essais secondaires. Les essais secondaires sont constitués de tests de sensibilité, d'irritation et d'implantation pour les biomatériaux. Dans le cadre d'évaluation pharmacologique, l'expérimentation *in vivo* évalue la pharmacocinétique de la substance et son métabolisme. L'expérimentation animale permet une approche plus proche de la clinique que l'*in vitro* grâce à la continuité des interactions cellulaires et entre les organes.

De plus, l'étude sur être vivant met en évidence des effets sur des organes éloignés de l'organe cible. Grâce au système sanguin et nerveux, les organes qui nous constituent communiquent entre eux et interagissent. Une substance absorbée ou un acte thérapeutique au niveau dentaire peut avoir des répercussions systémiques.

Par exemple, le diabète et la maladie parodontale sont intimement liés. Les études montrent que la parodontite constitue la 6^{ème} complication du diabète mais également que l'assainissement parodontal régule l'équilibre diabétique (36).

La recherche *in vivo* permet également d'évaluer la toxicité systémique des métabolites d'un produit. Lorsqu'un biomatériau est appliqué en bouche ou bien un médicament est ingéré, il est métabolisé par l'organisme, soit par les reins, soit par le foie. Un biomatériau ou un médicament peut être biocompatible ou ingéré à la dose non toxique déterminée lors des tests *in vitro*, mais ses produits de dégradation lors du métabolisme peuvent se révéler dangereux (9).

L'interprétation des résultats des études *in vivo* est plus facile car plus proche de la clinique. De plus, si le modèle animal choisi le permet, il permet de tester techniquement le protocole envisagé et d'évaluer la faisabilité de sa mise en œuvre et de déterminer ses limites.

Modèle animal	Avantages	Inconvénients
---------------	-----------	---------------

3) Limites

L'expérimentation sur modèle animal présente de nombreuses limites.

a. Prédictibilité limitée

Tout d'abord, il existe une variabilité physiologique entre les différentes espèces animales, ce qui offre la diversité de la faune. Cette diversité nous dessert dans le cadre des expérimentations animales. En effet, le but est de tester une substance ou un biomatériau en vue d'obtenir une Autorisation de Mise sur le Marché pour son utilisation chez l'Homme. Il est en fait difficile de prédire son efficacité et sa sécurité d'emploi chez l'Homme à partir des modèles animaux dits classiques (petits rongeurs, gros mammifères, primates, etc.).

Les protocoles expérimentaux sont établis au préalable et recherchent le modèle animal optimal pour l'expérimentation afin d'obtenir des résultats proches de notre réalité clinique et physiologie. D'un point de vue génétique et physiologique, les grands primates seraient les modèles animaux les plus pertinents grâce à notre proximité biologique, mais c'est également cette grande proximité génétique qui nous empêche éthiquement de les utiliser comme cobayes. Les animaux les plus utilisés restent les rongeurs qui sont moins chers et plus facilement manipulables mais ils présentent moins de similitudes avec l'espèce humaine. Les résultats obtenus ne sont pas assez transposables à l'Homme et ont une prédictibilité limitée (37).

Ci-après un tableau comparatif des animaux utilisés dans la recherche en biologie pulpaire (37–41)

Primates	<ul style="list-style-type: none"> - Animaux présentant le plus de similitudes du point de vue de la physiologie et de l'anatomie dentaire : organisation des tissus parodontaux comparable à la nôtre, ainsi que leur odontogénèse. - Utiles en parodontologie : développement des pathologies similaire, avec les mêmes symptômes cliniques 	<ul style="list-style-type: none"> - Éthique - Prix, captivité, transport - Manipulation difficile (ce sont de très grands animaux) - Comparable mais difficile d'avoir un nb de primates suffisant pour avoir de bonnes statistiques
Chiens	<ul style="list-style-type: none"> - Fort taux de pathologies parodontales - Taille des dents comparable à l'Homme - Structure des tissus gingivaux comparable - Absence de mouvements latéraux, absence d'occlusion des prémolaires, absence de points de contact - Composition de plaque différente - Les Beagles sont les chiens les plus utilisés de par leur comportement calme et une taille intermédiaire parmi les chiens ce qui facilite leur manipulation 	<ul style="list-style-type: none"> - Développent des gingivites mais passage à la parodontite rare (pas la même population bactérienne)
Rats	<ul style="list-style-type: none"> - Structure gingivale proche de l'homme - Croissance continue des dents - Mouvements dentaires - Une seule dentition - Molaires et prémolaires : apex fermés, couronne courte, pas de croissance continue - Incisives : très longue, croissance continue, apex ouvert. - Répartition de l'émail de l'incisive : épais en vestibulaire, faible en lingual pour compenser la mastication qui ronge les dents 	<ul style="list-style-type: none"> - Faible taux de maladies parodontales : nécessite de contaminer le parodonte avec bactéries et de ligaturer les dents. De plus, ne permet pas d'étudier les maladies parodontales au long terme à cause de la migration des dents et leur croissance continue. - Système immunitaire pas totalement fonctionnel - Matériel dentaire et instruments endodontiques souvent trop larges pour les canaux radiculaires : nécessité d'utiliser du matériel adapté
Souris	<ul style="list-style-type: none"> - Une seule dentition - Répartition de l'émail incisive : comme celle du rat - Incisives ont une croissance continue - Molaires subissent des modifications complexes de leur physiologie avec le vieillissement 	<ul style="list-style-type: none"> - Évolution des maladies parodontales très différentes à l'homme - Système immunitaire pas totalement fonctionnel - Matériel dentaire et instruments endodontiques souvent trop larges pour les canaux radiculaires : nécessité d'utiliser du matériel adapté
Furets	<ul style="list-style-type: none"> - Comme les Hommes, ils ont une denture temporaire et denture permanente - Évolution des maladies parodontales similaires à l'Homme 	

b. Interprétation des résultats

L'interprétation des résultats sur l'organe cible est plus facile que dans la recherche *in vitro* car l'organe évolue dans son environnement biologique. Néanmoins, même si un des avantages de l'*in vivo* est de pouvoir déterminer des effets systémiques et non locaux, un effet néfaste peut passer inaperçu s'il est non recherché et donc non évalué.

De plus, la durée de l'essai est parfois trop courte par rapport au temps d'apparition de l'effet secondaire qui ne pourra donc pas être détecté avant les essais cliniques chez l'Homme.

Par ailleurs, les manipulations génétiques permettent d'engendrer des animaux porteurs de variations génétiques observées chez l'homme, et dont l'expression peut être modulée de façon ciblée dans l'espace et le temps. Cette simulation permet de se rapprocher au mieux des pathologies étudiées et aussi d'explorer le rôle physiologique de ces gènes. Par exemple, nous sommes capables d'induire un diabète à un animal pour ensuite chercher le meilleur moyen pour le traiter.

En revanche, dans le domaine dentaire, il est parfois compliqué de reproduire les pathologies cibles comme la carie ou la lésion parodontale (9). Il faut trouver un animal qui développe les mêmes pathologies que nous, ou bien les lui induire.

Le rat est l'animal le plus utilisé dans les recherches *in vivo* portant sur les domaines de la chirurgie, l'anesthésie, l'implantologie, la parodontologie, l'endodontie et l'orthodontie (42). Les chercheurs comparent les différentes caractéristiques des animaux à disposition pour choisir celui le plus adapté à leur domaine de recherche.

c. L'éthique

Le principal inconvénient de la recherche sur modèle animal est la question éthique qu'elle soulève. Bien que l'expérimentation sur les animaux ait longtemps été considérée comme imputable à la recherche fondamentale pour l'évaluation toxicologique des substances, elle est de plus en plus contestée par l'opinion publique qui considère certains animaux très proches de l'Homme et méritant donc les mêmes protections. Les mouvements d'opposition à la pratique sur les animaux se sont amplifiés ces dernières années, on peut citer notamment l'initiative citoyenne européenne dite « Stop-vivisection », et ont conduit à des réponses politiques et législatives de la part de la commission Européenne (43).

En effet, après avoir gradué les souffrances subies par les animaux en expérimentation dans les laboratoires anglais, W.M.S. Russell et R.L. Burch ont développé un programme de mise en place et de développement de lignes directrices dites "humaines", appelé la "règle des 3 R". Ces guidelines sont désormais réglementées par le Conseil de

l'Europe (convention STE n°123), l'Union Européenne (directive 2010/63/UE) et la France (44).

La règle des 3R comprend les points suivants : Reduce (réduire) le nombre d'animaux en expérimentation, Refine (raffiner) la méthodologie utilisée et Replace (remplacer) les modèles animaux.

- Réduire

Le but de ce point est de réduire le nombre d'animaux utilisés dans le cadre d'expérimentations (45).

Cet objectif peut être atteint de différentes manières :

- Limitation aux expériences considérées comme indispensables
- Réduction des répétitions inutiles. Nous avons parlé précédemment (voir partie I) de l'un des principes fondamentaux de la recherche expérimentale qui consiste en la confirmation des résultats par les pairs. Le but de ce point est de limiter les études répétitives, et donc le nombre d'animaux utilisés, réalisées dans un pays pour aligner les résultats publiés aux exigences législatives d'un Etat en vue d'une autorisation de mise sur le marché ou d'une vérification d'innocuité/toxicité. Cela passe par une harmonisation sur le plan européen et international des exigences en sécurité (essais toxicologiques par exemple), des normes en rigueur et de reconnaissance mutuelle de la validité des protocoles et des données scientifiques.
- Rédaction d'un protocole expérimental précis et pertinent, qui ne nécessitera pas d'autres essais sur les animaux pour vérifier les données. Il doit permettre de déterminer le nombre exact d'animaux nécessaires à l'obtention de résultats statistiquement significatifs afin de ne pas en utiliser plus qu'il n'en faut.

Le protocole doit déterminer un modèle animal proche sur le plan biologique pour diminuer la variabilité des résultats.

- Raffiner

Le concept du raffinement est de veiller au bien-être animal tout au long de leur vie et durant les différentes étapes du protocole expérimental(46).

- On peut raffiner avant l'expérimentation en améliorant les conditions de transport, d'élevage et d'hébergement des animaux et entraîner les animaux à coopérer grâce à du renforcement positif. On essaye d'améliorer leur bien-être et diminuer leur état de stress. Depuis une vingtaine d'années, on peut noter des progrès considérables dans ce domaine : la taille des cages a augmenté, les primates ont des volières comparables à celles des zoos et les souris ont droit à un environnement enrichi et amélioré.
- Le raffinement durant l'expérimentation concerne les méthodes choisies et les protocoles. Les avancées dans les techniques d'imagerie non-invasives permettent notamment l'obtention de résultats sans chirurgie et avec un plus petit nombre d'animaux. L'utilisation d'analgésiques et anesthésiques est également recommandée lors de tests douloureux.

- Le raffinement continue après l'expérimentation en exploitant au mieux les résultats fournis.

- Remplacer

Ce point encourage le chercheur à ne pas réaliser ses expériences sur l'animal quand cela est possible, c'est-à-dire utiliser des méthodes alternatives comme la modélisation *in vitro*, la culture d'explants, les bioréacteurs, les organes artificiels, l'ingénierie tissulaire *in vitro* ou des modèles bio-informatiques. C'est dans ce but que nous développerons plus tard la culture cellulaire en 3 dimensions pour les recherches sur la biologie pulpaire (44).

Les bioréacteurs, retrouvés également sous la dénomination de fermenteurs, sont des appareils qui permettent la multiplication des micro-organismes (bactéries, levures, cellules animales ou végétales) en contrôlant les conditions de culture (température, pH, aération...).



Figure 17 : Culture de cellules mammifères effectuée dans un bioréacteur de laboratoire

4) La recherche *in vivo* appliquée à la biologie pulpaire

La biologie pulpaire étudie la biologie cellulaire de la pulpe dentaire *in vitro*, mais également les spécificités odontologiques de l'organe dentaire, en prenant compte de son environnement.

Cela signifie que le modèle animal qui fera l'objet d'expérimentations doit être assez proche de l'Homme sur le plan biologique, mais aussi sur le plan odontologique. C'est en cela que le choix de ce modèle est complexe, pas uniquement dans le domaine de la régénération pulpaire, mais dans le domaine de l'ingénierie tissulaire en général (76).

Actuellement, les recherches sur la biologie pulpaire cherchent à développer de nouvelles substances pour améliorer la régénération de la pulpe, diminuer la douleur inflammatoire, la cicatrisation pulpaire et chercher une bioactivité des matériaux. Les modèles animaux utilisés dans ce cadre sont divisés en deux catégories : les modèles ectopiques et les modèles orthotopiques.

a. Les modèles ectopiques

i. Définition

Les modèles ectopiques sont les modèles les plus utilisés actuellement dans la recherche sur la régénération. Ils consistent à implanter le produit d'ingénierie tissulaire de manière sous-cutanée ou intra musculaire chez l'animal. La localisation dorsale en sous-cutané est la plus courante, mais il existe aussi des implantations dans la capsule rénale (37).

Ce modèle est choisi dans le cadre de recherches biologiques sur les caractéristiques des cellules souches ou pour étudier différents matériaux utilisés en tant que matrice dans l'ingénierie tissulaire.

Lors de recherches *in vivo* sur modèles ectopiques, les modèles animaux utilisés sont souvent de petits gabarits comme les rats ou souris, qui sont plus acceptés éthiquement que les chiens et chats par le grand public (ces animaux sont considérés comme des animaux de compagnie). Ils offrent aussi l'avantage d'être plus manipulables que les animaux de grandes tailles et moins coûteux. Un autre avantage est la possibilité d'utiliser plusieurs sites d'implantation chez le même animal ce qui permet de comparer différentes méthodes tout en se libérant du facteur d'erreur de la variabilité de réponse en fonction de l'individu mais aussi de favoriser la règle des 3R (37).



Figure 18 : Photographie d'une souris avec un greffon sous-cutané placé de manière controlatérale au site d'incision. Prescott et al (47)

ii. Avantages

Dans le cadre de l'exploration de la biologie pulpaire, le modèle animal ectopique présente un intérêt majeur par rapport aux expérimentations *in vitro*. En effet, il met en relation le système implanté, bien souvent une dent contenant le produit d'ingénierie tissulaire développé préalablement *in vitro*, avec le système vasculaire de l'hôte.

L'angiogenèse, c'est-à-dire le processus de formation de nouveaux vaisseaux sanguins à partir de capillaires préexistants, est primordiale pour la biologie pulpaire. On retrouve ce phénomène de revascularisation lors du traitement de dents immatures, de la réimplantation de dents avulsées suite à un trauma ou bien dans les protocoles de régénération pulpaire.

Lors des expérimentations *in vitro*, les cellules sont maintenues vitales grâce au milieu de culture contenant les nutriments nécessaires à leur croissance mais il n'y a pas de système vasculaire viable.

Lors de l'implantation d'un greffon, les cellules endothéliales se différencient en des micro vaisseaux fonctionnels afin de s'anastomoser avec la vascularisation de l'animal (48). Les études de l'équipe de Nör et al (33), ont observé les cellules endothéliales dispersées dans la matrice dès le premier jour d'implantation, puis sous forme de structure tubulaire vide au jour 5. Entre le 7^{ème} et le 10^{ème} jour, on observe que les cellules endothéliales constituent des micro vaisseaux fonctionnels. Cette anastomose entre le greffon et l'animal

permet une vascularisation du greffon et donc un apport de nutriments et oxygène aux cellules implantées.

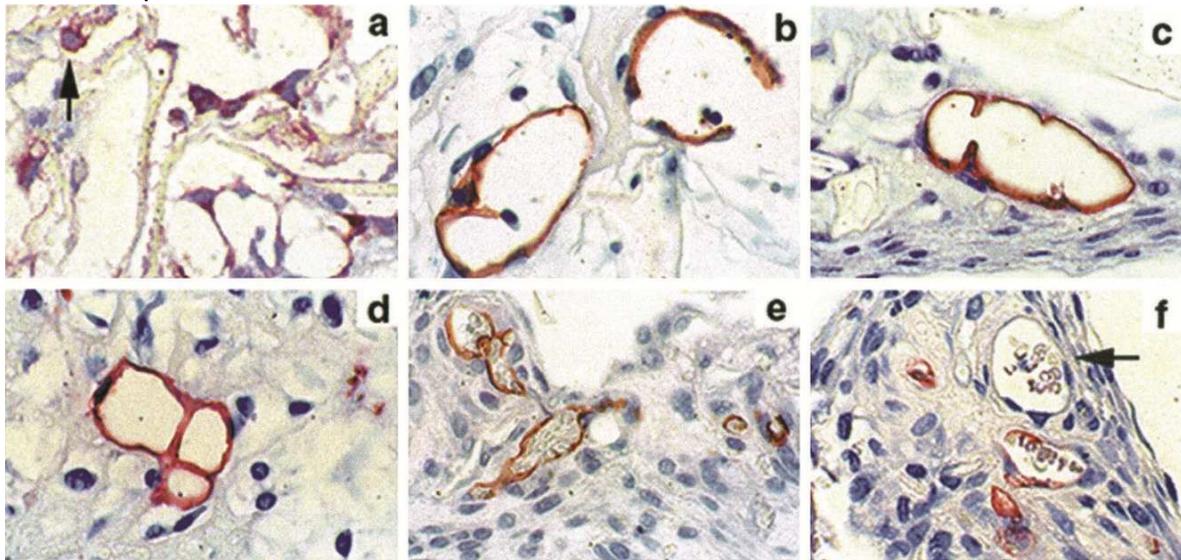


Figure 19: Photographies de coupes microscopiques à grossissement $\times 1000$ du développement de micro vaisseaux dans une souris immunodéficiente. (a) formation de structures tubulaires vides à 5 jours. (b, c, d) Les cellules endothéliales migrent à l'intérieur des tubes autour des jours 5 à 7, afin de le diviser en 2 ou 3 petits vaisseaux. (e,f) 14 jours après l'implantation, des cellules sanguines de la souris sont visibles dans la lumière des micro vaisseaux.

iii. Limites

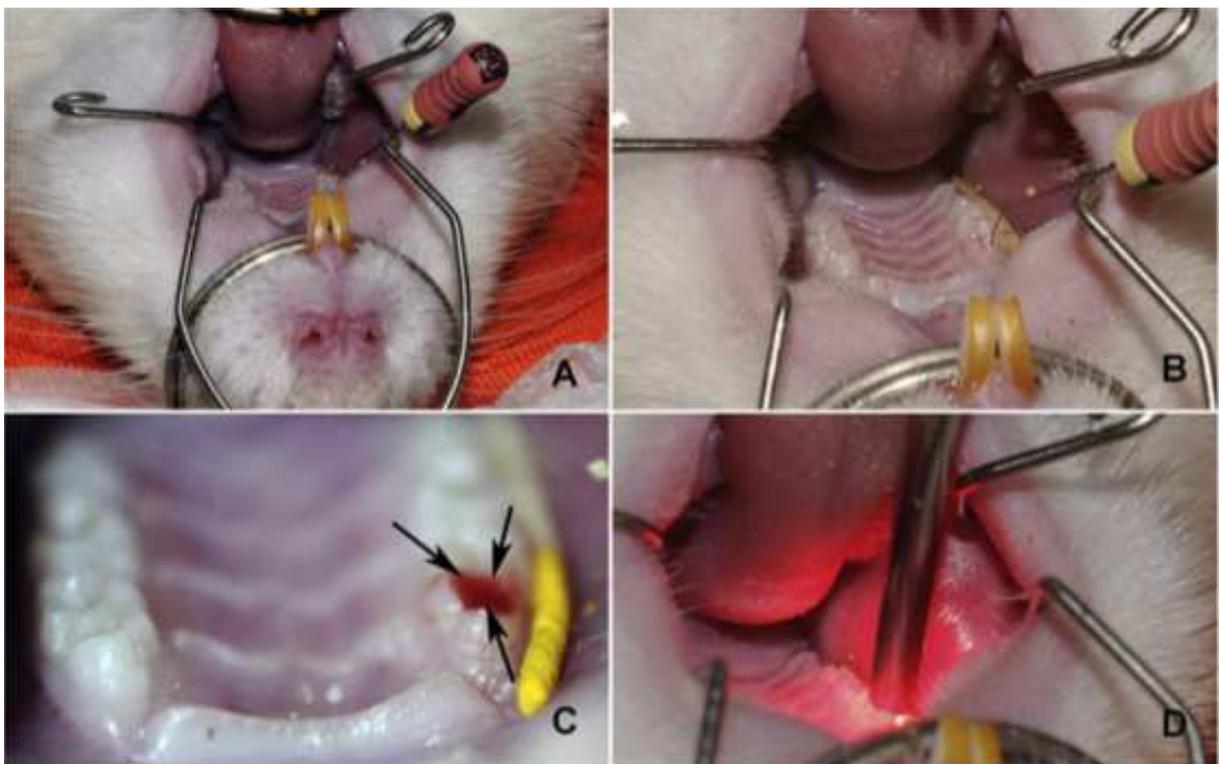
En revanche, ce modèle d'étude présente certaines limites. La localisation du produit d'ingénierie tissulaire dans une région structurellement différente de celle concernée cliniquement permet difficilement d'obtenir des résultats pertinents pour une application clinique.

De plus, il a été montré que les résultats expérimentaux de régénération tissulaire variaient de manière significative selon le site d'implantation ectopique (49).

Pour finir, il s'agit d'un modèle simplifié, dont le but est de mettre en relation un produit d'ingénierie tissulaire ou la substance avec le système vasculaire de l'organisme, mais il ne mime absolument pas les conditions retrouvées cliniquement lors d'un protocole de régénération pulpaire. On note notamment l'absence d'interactions avec le système nerveux et lymphatique de l'hôte, le rongeur étant immunodéprimé. En effet, le système immunitaire de l'hôte détecte les antigènes inconnus à la surface du greffon et l'attaque : c'est un rejet. Ce rejet peut être sévère et détruire le produit implanté, c'est pourquoi l'animal est traité par des immunosuppresseurs qui éliminent sa capacité à reconnaître et détruire des substances étrangères (50).

b. Les modèles orthotopiques

Lorsque l'implantation de l'objet d'étude est localisée sur le site anatomiquement correct, il s'agit d'un modèle orthotopique. Ces modèles se rapprochent plus de la situation clinique et sont généralement utilisés après la recherche sur modèles ectopiques. Dans le cadre de la régénération pulpaire, ils consistent en l'application des produits directement dans la dent de l'animal, et donc une mise en situation proche de la physiologie et biologie clinique. Les systèmes vasculaire, nerveux et lymphatiques sont fonctionnels, et les réactions cellulaires suite aux stimuli sont naturelles.



(29) *Figure 20 : Préparation endodontique de la racine mésiale de la première molaire chez le rat. Moreira et al, 2016*

Dans le cadre de la recherche orthotopique, le chien est l'animal le plus utilisé et sa grande taille permet la mise en œuvre du protocole clinique pour appliquer la substance.

L'expérience évalue ainsi les comportements précliniques du produit de régénération pulpaire, mais également la faisabilité et la pertinence du protocole qui pourra être appliqué ensuite chez l'Homme (37).

Néanmoins, l'utilisation de ces modèles porte à débat d'un point de vue éthique car ces animaux sont considérés comme des animaux de compagnie, et le coût est nettement supérieur. De plus, ces modèles présentent des contraintes notamment au niveau de l'élevage et leur croissance plus lente que les rongeurs.

La demande de modèles animaux dans le cadre d'expérimentations sur la biologie pulpaire augmente. Premièrement, une analogie inter-espèces n'est jamais parfaite, que ce soit au niveau des symptômes ou bien des réponses aux traitements. Cette raison justifie l'intérêt des chercheurs à multiplier les modèles afin de croiser les résultats et être plus prédictifs sur une application clinique potentielle chez l'Homme. D'autre part, les avancées prometteuses des recherches réalisées au cours de la dernière décennie vont certainement augmenter le nombre d'études orthotopiques dans le domaine de la régénération pulpaire (51).

A ce jour, il y a donc une réelle nécessité de trouver des modèles alternatifs et plus proches de l'Homme qui permettraient un développement plus rapide et plus efficace du domaine de l'ingénierie tissulaire pulpaire ainsi qu'une prédictibilité accrue des résultats.

c. La part de l'imagerie dans la recherche *in vivo*

Les études ont longtemps été réalisées uniquement à travers des analyses histologiques post mortem, ce qui nécessitait des cohortes importantes afin d'étudier les différents temps de cicatrisation. L'introduction de méthodes d'imagerie *in vivo* non invasives dédiées permet actuellement d'étudier plus finement les différentes étapes de l'intégration du matériau et de la cicatrisation chez le petit animal (souris, rat), en utilisant un seul groupe étudié à plusieurs temps, sous anesthésie générale (52). Ces techniques donnent accès à de nombreux paramètres anatomiques et physiologiques.

L'utilisation de l'imagerie par rayons X offre des informations rapides sur l'évolution des maladies carieuses ou parodontales, ainsi que sur la structure minérale des dents. Cette technique rapide et relativement peu coûteuse présente cependant l'inconvénient de présenter un contraste peu marqué pour les tissus mous (53).



Figure 21 : Image radiographique de la canine d'un furet (30)

L'utilisation de microscanner d'animaux vigiles permet l'appréciation de la morphologie et quantification des structures osseuses et minérales sans sacrifice de l'animal (52).

Lors du sacrifice de l'animal, des coupes histologiques sont possibles pour comparer avec les données de l'animal vigile.

En conclusion, en plus des enjeux économiques et éthiques, l'expérimentation *in vivo* sur modèle animal présente progressivement ses limites. Elle ne peut pas reproduire fidèlement la réponse humaine et de nombreuses pathologies sont spécifiques à certaines espèces (par exemple la parodontite doit être induite chez le chien avec des ligatures). De plus, la principale cause d'échec d'un nouveau médicament lors de l'essai clinique est la toxicité hépatique, qui n'a pas pu être suffisamment anticipée sur le modèle animal (54).

IV. Les structures organoïdes en endodontie

1) Les structures organoïdes en général

Il y a un besoin éthique et financier de créer un modèle qui schématise à la fois l'organisation cellulaire de l'organe cible ainsi que ses fonctions, afin d'explorer la diversité des réponses des organismes à leur environnement (55).

C'est ainsi que le milieu de la recherche s'est intéressé au développement de systèmes modèles plus proches de l'Homme en termes de prédictibilité. En combinant la maîtrise grandissante des outils de contrôle de la différenciation cellulaire avec celle de l'édition des gènes et celles des technologies de culture multidimensionnelles, des innovations majeures voient le jour (56).

Les structures organoïdes sont donc des constructions multicellulaires en trois dimensions qui reproduisent à certains niveaux la complexité de la structure d'un organe et ses fonctions (57).

Ces objets biologiques que l'on nomme organoïdes, se démarquent des simples cultures par la capacité à reproduire au moins une fonction de l'organe qu'ils miment (56). L'exposition des cellules aux contraintes spatiales d'un environnement 3D permet aux composantes cellulaires de s'auto-assembler, en favorisant les interactions entre cellules, et d'exercer leurs fonctions physiologiques, conduisant à des micro-organes fonctionnels *in vitro*. C'est dans ce contexte biophysique et biochimique que les organoïdes reproduisent les fonctions des organes et tissus (55).

Les structures organoïdes peuvent provenir d'un organe Humain (exemple tooth slice) ou de cellules souches (grâce à l'ingénierie tissulaire qui forme des cultures en 3 dimensions). Dans la mesure où ces organoïdes peuvent être obtenus à partir de cellules de sujets humains, ils sont pressentis comme plus prédictifs de la réponse de l'homme à des processus infectieux (58), à des traitements médicamenteux (59) ou à la distribution et au métabolisme des médicaments dans les tissus.

Grâce à leur manipulation aisée, leur capacité à croître et la possibilité de les manipuler génétiquement, elles sont adaptées à l'étude de la physiologie et de la pathologie des organes *in vitro*. Les structures organoïdes sont plus proches des conditions retrouvées dans le corps Humain et leurs résultats sont plus facilement transposables à une application clinique (56).

A l'heure actuelle, deux types de structures organoïdes sont utilisés lors de recherches sur la biologie pulpaire : la culture cellulaire en trois dimensions et les tooth slice.

La culture cellulaire en trois dimensions utilise l'ingénierie tissulaire pour créer un modèle multicellulaire organisé en plusieurs niveaux. L'ingénierie tissulaire repose sur trois

éléments : l'utilisation de cellules souches, d'une matrice extra-cellulaire et des facteurs de croissance qui permettent la différenciation des cellules souches en cellules ciblées.

Le modèle expérimental de tooth slice, traduit littéralement par « tranche de dent », quant à lui, nécessite des dents extraites et sélectionnées selon des critères précis. Il s'agit le plus souvent de dents de sagesse saines dont on prélève ensuite une coupe transversale d'un millimètre d'épaisseur. Elles sont ensuite maintenues fonctionnelles grâce à un milieu de culture adapté.

2) Les cultures cellulaires en 3 dimensions

En tant que produit de l'ingénierie tissulaire, ces cultures sont composées de cellules souches, d'une matrice extracellulaire et de facteurs de croissance.

Durant la dernière décennie, la multipotence des cellules souches a été exploitée pour créer des « mini-organes » *in vitro*, les organoïdes. Ils dérivent de cellules souches différenciées et qui se sont auto-assemblés en culture de trois dimensions qui recopie la composition, l'architecture et certaines fonctions d'un tissu (60).

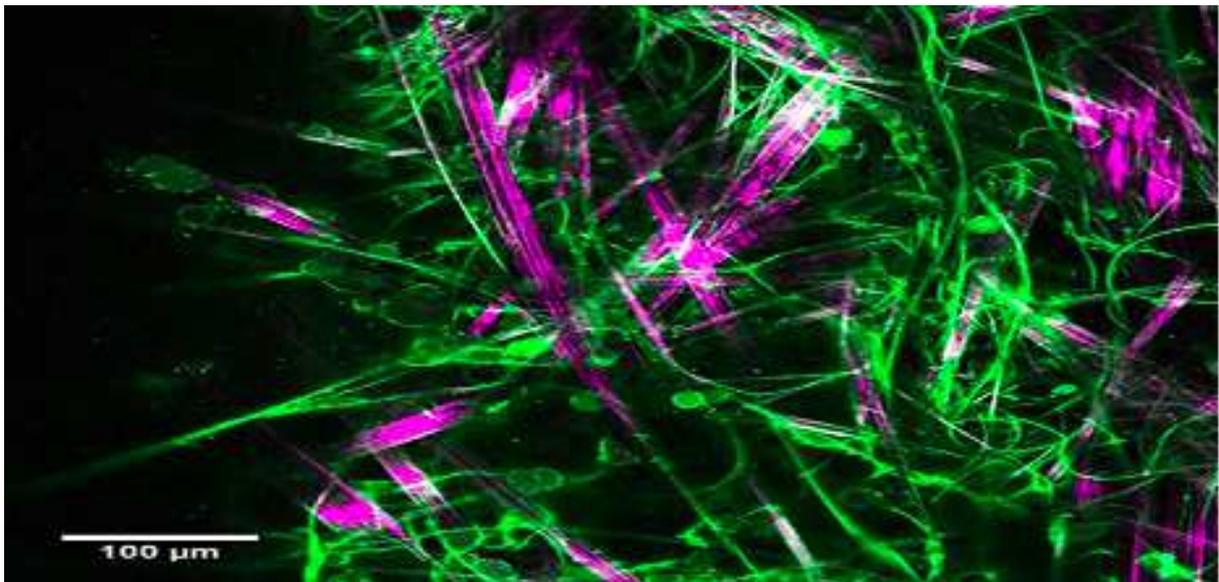


Figure 22: Photographie par microscope électronique de la culture de neurones en 3D

La composition du milieu de culture est essentielle pour le développement et la croissance des organoïdes. Il doit maintenir les fonctions des cellules souches ainsi que guider leur prolifération et différenciation (61).

Les matrices sont indispensables à l'ingénierie tissulaire et correspondent à un échafaudage dont les cellules se servent de base afin de former un tissu. Elles facilitent l'apport de cellules, de facteurs de croissance, la survie cellulaire ainsi que les interactions cellules/matrice (62). Il a été démontré que les matrices maintenaient la viabilité cellulaire, l'expression génique, les capacités d'adhésion et la structure cellulaire des cellules souches mésenchymateuses d'origine dentaire (63).

Il existe des matrices à base d'hydrogel ou bien inertes. Les matrices issues d'hydrogels peuvent être d'origine animale (collagène), végétale (alginate) ou synthétique. Les matrices inertes sont composées de biomatériaux comme les polymères ou le titane (64).

Grâce à leurs propriétés de biodégradabilité, de biocompatibilité et leur faible antigénicité, les polymères sont largement utilisés pour constituer les matrices.

Le Poly lactic-co-glycolic acid (PLGA) est un copolymère communément retrouvé comme biomatériau et ses propriétés mécaniques et physiques sont très utiles pour

l'utilisation clinique (65). Les matrices à base de collagène, de céramique HA/TCP (hydroxyapatite) ou bien de titane, promeuvent de manière égale la croissance et la différenciation de DPSCs *in vitro* (66).

Cependant, la diffusion de l'air et des nutriments dans une matrice statique n'est pas équitable pour chaque cellule. C'est pourquoi l'équipe de Li et al (2017), a testé une matrice avec microcavités simulée de manière dynamique (SMG : simulated microgravity). Les résultats de l'étude montrent une augmentation de la capacité de différenciation odontogénique et proliférative des cellules souches par rapport à un système avec une matrice statique (62).

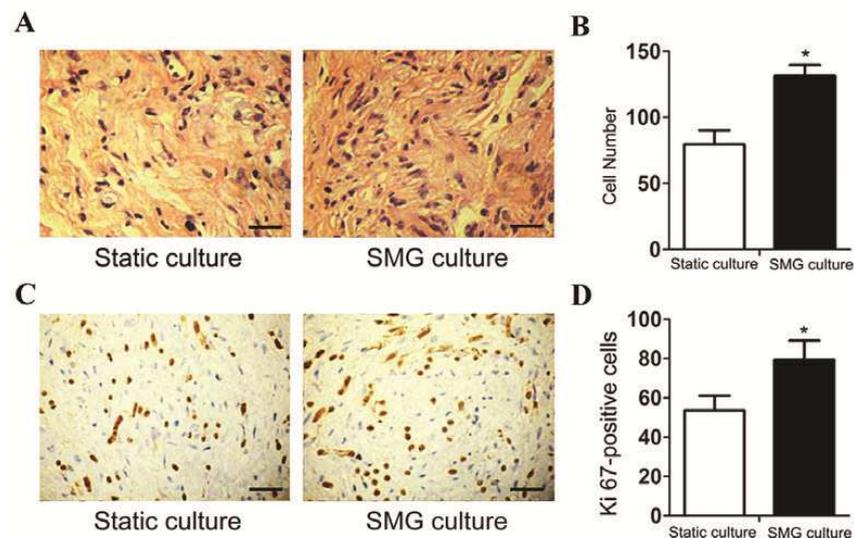


Figure 23 : Effets de la culture en 3D avec une matrice SMG sur la croissance de DPSCs *in vitro* à 1 et 7 jours

a. Comparaison 2D/3D

Les cultures en 3 dimensions se distinguent des cultures en 2 dimensions (monocouches et monocellulaires) en promouvant un haut niveau de différenciation cellulaire et d'organisation tissulaire.

La particularité et la clef des cultures cellulaires en 3 dimensions résident en la capacité des cellules à s'auto-organiser et créer des voies de signalisation et des interactions avec la matrice extracellulaire (67).

Les cultures cellulaires en 3D ont une durée de vie prolongée par rapport aux cultures monocouches et monocellulaires des études *in vitro* classiques, c'est-à-dire en deux dimensions. Il s'avère que leur durée de vie est également supérieure à celle des prélèvements par biopsie des organes issus du corps humain pour des études *in vivo*. Cette différence de viabilité s'explique par la stabilité accrue des modèles en 3 dimensions grâce à la matrice extra-cellulaire. Les équipes de Bercu et al, 2013, ont obtenu des modèles stables pendant plus de 2 mois dans le cadre de recherches sur les cellules du cordon ombilical (68).

Les cultures en 3D sont constituées de cellules différenciées et non différenciées baignant dans une matrice cellulaire. Il a été montré (Li et al, 2002) que les cellules cultivées dans une matrice plutôt que dans une culture en 2D, ont des taux de prolifération plus lents et sont capables de survivre plus longtemps grâce à la communication entre les cellules et l'échange de signaux.

Des études utilisant le système en 3D ont permis une meilleure compréhension des mécanismes impliqués dans la prolifération cellulaire. En contrôlant le taux d'hydrogels dans les matrices, on peut jouer sur leur élasticité et rigidité jusqu'à trouver l'environnement optimal pour la différenciation des espèces cellulaires spécifiquement étudiées. Ainsi les cellules peuvent changer de forme et créer des connections entre elles (67). La mobilité cellulaire est un prérequis nécessaire à l'étude de la biologie pulpaire et sa régénération. La diversité des modèles possibles en jouant sur la composition de la matrice optimisent une mobilité proche de celle retrouvée chez l'Homme (1).

Dans les structures organoïdes, les cellules croissent dans un environnement complexe constitué de différentes cellules et d'une matrice bien structurée. Les observations montrent un comportement cellulaire mimétique à l'*in vivo* caractérisé par une adhésion intercellulaire ainsi qu'une communication par des signaux entre les cellules. Dans la culture *in vitro* dite « classique », c'est-à-dire monocellulaire et monocouche, il existait déjà des signaux intracellulaires ce qui correspond à des signaux entre cellules de même espèce. Dans le modèle expérimental en trois dimensions, les signaux permettent également une communication intercellulaire, plus précisément entre les différentes espèces de cellules qui constituent le tissu (1).

En effet, les lignées hétérocellulaires retrouvées dans les structures organoïdes se comportent comme des co-cultures, reproduisant les réponses de l'organe cible face à différents stimuli, facteurs, et offrent une meilleure compréhension de la complexité physico-chimique des réactions d'un organe.

Les cellules cultivées en tant que modèles en 3 dimensions montrent donc de nombreuses caractéristiques plus proches des conditions de l'*in vivo* que les cultures en 2D (69). Ces modèles d'étude ont prouvé être plus réalistes pour interpréter les résultats d'une étude et se projeter sur les applications *in vivo*. Alors que les cultures cellulaires en 2D nous offrent un matériel d'étude homogène, cultiver les cellules en 3 dimensions les imposent de se comporter d'une manière plus proche des conditions naturelles (1).

b. Domaines d'application

Ces modèles permettent de mieux appréhender les interactions entre les cellules à l'état physiologique mais ils ont également un domaine d'applications variées dans la recherche biomédicale. En effet, en jouant sur la composition de la matrice extracellulaire et la différenciation cellulaire des cellules souches, on peut obtenir des structures organoïdes

diverses et variées, adaptées à tout type de recherches. On obtient un grand nombre d'information cellulaire pour la recherche fondamentale mais cette flexibilité de culture étend les recherches aux applications thérapeutiques.

- En biologie et ingénierie tissulaire

Grâce aux nombreuses interactions intercellulaires et au fort mimétisme des structures organoïdes, elles constituent un excellent modèle pour les études du développement biologique et pour l'ingénierie tissulaire. En effet, grâce aux mécanismes de contrôle cellulaire, signalisation cellulaire, mutation et vieillissement cellulaire, les structures organoïdes reproduisent fidèlement les fonctions et réponses de l'organe cible. Elles ont permis une meilleure connaissance des fonctions cellulaires comme la prolifération, l'adhésion, la survie cellulaire, la morphologie et l'impact du microenvironnement sur la réponse cellulaire. Ces connaissances ont de nombreuses applications dans la biologie régénérative et d'autres domaines thérapeutiques (1).

De plus, les organoïdes permettent aux chercheurs de comprendre la morphogénèse qui mène à la formation d'organes et de tissus (70).

- En pharmacologie

La recherche en phase pré-clinique *in vitro* donne très peu d'informations sur le comportement toxicologique des nouveaux médicaments. Il est ensuite nécessaire de faire de nombreux tests sur les animaux pour établir une dose efficace, une dose tolérance et une dose létale. Ce sont des tests longs, très coûteux et qui posent des problèmes d'éthique. Les structures organoïdes comblent l'écart entre l'*in vitro* conventionnel et les tests sur modèles animaux grâce à l'évaluation des actions synergiques et des doses de tolérances *in vitro*. Les structures organoïdes offrent une prédictibilité accrue sur les résultats humains au lieu de ceux animaux, tout en ayant un coût inférieur.

Ainsi la recherche pharmacologique peut gagner en efficacité notamment pour la sélection de médicaments, l'évaluation de la toxicité et des substances inefficaces à un stade plus précoce de la recherche pré-clinique. L'utilisation de ce modèle d'étude entre l'*in vitro* et l'*in vivo* est donc plus simple et constitue un outil efficace pour établir la génotoxicité, la cytotoxicité et les effets à long terme des médicaments, ce qui était impossible jusqu'alors car la durée de vie cellulaire des cultures en 2 dimensions est trop courte. Les structures organoïdes optimisent la phase pré-clinique et réduisent le nombre d'animaux nécessaire pour la suite des expérimentations (1).

- En cancérologie

Jusqu'à présent, il y a une grande difficulté à produire des traitements anti-cancéreux efficaces de par la prédictibilité limitée des modèles *in vitro* (56). Les structures organoïdes mimant des tumeurs réagissent plus fidèlement aux essais de médicaments anti-cancéreux que les cellules en 2D. En effet, les cellules tumorales organisées en trois dimensions se disposent selon les trois couches d'une tumeur avec le centre nécrotique, le stroma tumoral

et la couche externe proliférative. On retrouve de nombreuses caractéristiques de la croissance *in vivo* des cellules cancéreuses dans les cultures en trois dimensions, en particulier durant la croissance primaire de la tumeur, avant l'apparition de la vascularisation tumorale.

Les recherches sur le cancer concernant les biomarqueurs, l'invasion tumorale, les métastases et l'angiogénèse tumorale ont largement utilisé des structures organoïdes (71,72).

- Un modèle pour étudier maladies infectieuses

Les structures organoïdes remplissent régulièrement leur promesse de modéliser des maladies humaines, contrairement aux animaux qui n'expriment pas forcément les mêmes pathologies et mêmes symptômes cliniques que nous. Comme ils contiennent différents types cellulaires du tissu d'origine, les organoïdes peuvent copier les maladies infectieuses et leur relation avec l'hôte.

Prenons l'exemple du virus ZIKA, qui induit des modifications tératogènes sur les nouveau-nés quand une mère est infectée lors de sa grossesse. Des cerveaux-organoïdes ont permis de comprendre le mécanisme d'infection du virus lors du développement embryologique du cerveau (74) et ainsi de créer un traitement pour prévenir et guérir du virus ZIKA.

c. L'application en biologie pulpaire

- Etude de l'odontogénèse

En 2019, l'équipe de Rowoski et al (2019), a reproduit l'élément déclencheur des premières étapes du développement *in vivo* de la dent : le processus de condensation mésenchymateuse. Pour ce faire, ils ont édifié un organoïde de la taille d'un germe de dent humaine qui exprimait les marqueurs de l'odontogénèse à partir de cellules souches de la pulpe dentaire (DPSCs).

Afin d'imiter le processus de condensation, les DPSCs étaient cultivées en suspension.

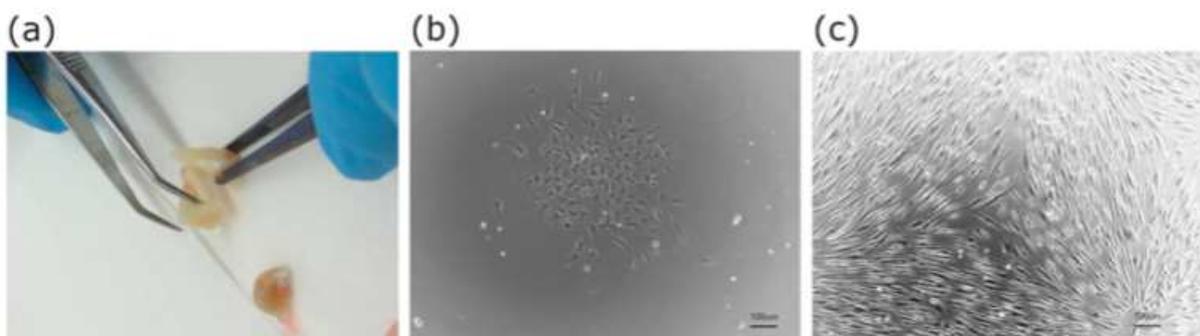


Figure 24: Isolement et caractérisation des cellules de la pulpe dentaire (75)

- (a) Prélèvement de la pulpe dentaire d'un extrait de dent
- (b) Formation d'une culture *in vitro* de DPSCs 72h après le prélèvement
- (c) Prolifération des cellules de DPSC dans des conditions de culture cellulaire standard.
On observe la morphologie en fibroblastes

Après 12h, les cellules souches ont été intégrées à un réseau cellulaire où elles se sont organisées jusqu'à créer des adhésions et voies de signalisations entre elles.

Ainsi, un système *in vitro* en 3 dimensions s'est créé sous la forme d'une condensation mésenchymateuse de 500 micromillimètres de diamètre qui mime son équivalent humain *in vivo* durant l'odontogénèse. Dans ce modèle de culture, l'organoïde

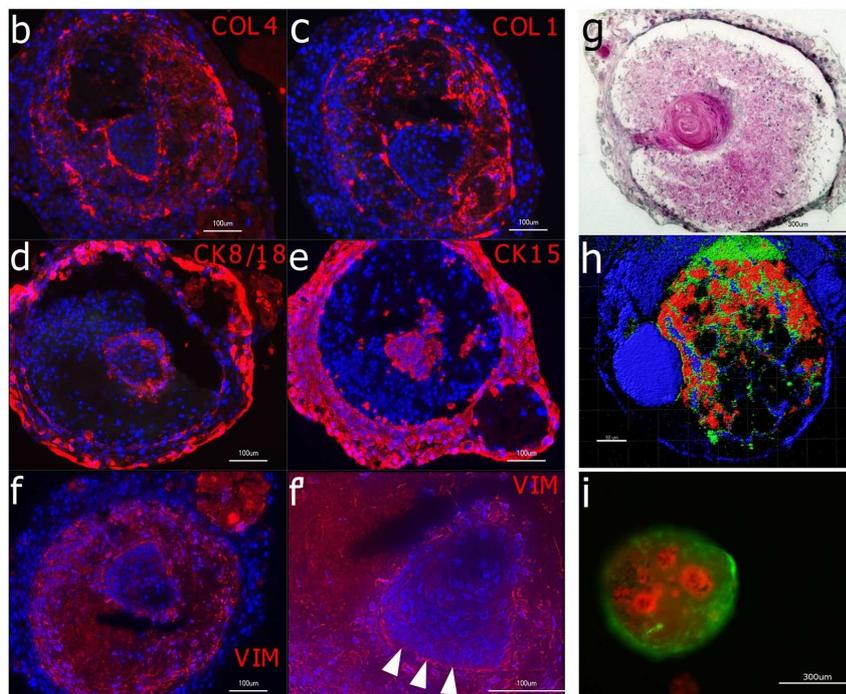


Figure 25: Interaction de la condensation mésenchymateuse avec les cellules épithéliales. Les analyses immunohistologiques (b-f) montrent une organisation structurée à l'intérieur de la coculture après 4 semaines. (g) La coloration à l'éosine montre une structure épithéliale en cerclage, indiquant la migration des kératinocytes à l'intérieur de la condensation mésenchymateuse. En (h), la coculture est analysée grâce à l'auto-fluorescence. Dans (i), on observe les odontoblastes en vert et les kératinocytes gingivaux en rouges grâce à des marqueurs sous microscopes à fluorescence. (75)

formé à partir des DPSCs pouvait induire des transcriptions de gènes odontogéniques sur les cellules qui ont lieu lors du processus de condensation *in vivo*. En effet, l'étude a montré que le modèle produisait du TGF- β , un facteur de croissance impliqué dans le processus de condensation mésenchymateuse, en régulant la prolifération cellulaire et l'expression de certains gènes comme DSPP (à l'origine de la création de la dentine) et DMP1 (à l'origine de la minéralisation de la dentine). Ce phénomène était impossible à reproduire avec les cultures cellulaires en 2 dimensions.

L'analyse de la transcription lors des phases précoces de l'odontogénèse a révélé que les gènes exprimés sont stimulés par des voies de signalisations et fonctions biologiques en rapport avec la condensation mésenchymateuse *in vivo*.

Cette méthode a présenté un modèle et outil efficace pour les analyses des mécanismes mésenchymateux sans utiliser de modèle animal. De plus, la culture de cellules DPSCs issues de dents de sagesse va permettre le développement de stratégies prometteuses dans la régénération dentaire (75).

- Culture de cellules mésenchymateuses issues de la pulpe dentaire

La découverte des cellules souches et de leur potentiel de différenciation et de prolifération a révolutionné l'ingénierie tissulaire. Malgré tout, leur utilisation reste difficile en raison des questions éthiques et de l'accessibilité de la source des cellules (par exemple la moelle osseuse). L'une des percées de la recherche sur les cellules souches est la découverte des cellules souches issues des tissus dentaires (33). Accessibles lors d'une simple extraction dentaire, ces cellules d'origine mésenchymateuse sont capables de se différencier sous l'influence de facteurs de croissance dans différentes lignées cellulaires : ostéogéniques, adipogéniques et neurales. Leur prélèvement soulève peu de questions éthiques et permet d'obtenir un grand nombre de cellules (76).

Les cultures en monocouche de ces cellules souches ne permettent pas d'utiliser pleinement leur potentiel. Au contraire, les cultures de cellules en 3 dimensions miment mieux la situation *in vivo* ce qui facilite la différenciation, la communication intercellulaire et l'expression des cellules souches. L'utilisation de micro-échafaudages poreux dans ce cadre offre de nombreux avantages grâce à une large surface de contact, une moindre quantité de milieu de culture et l'organisation des cellules en 3 dimensions pour leur croissance, comme retrouvée dans l'*in vivo*.

L'équipe de Ronak et al (2016), a les cellules souches de la pulpe dentaire (DPSCs) cultivées avec des micro-échafaudages de PLGA (poly (lactic-co-glycolic acid)).

Elles ont maintenu leur plasticité, leur multipotence, et se différencient après stimulation appropriée dans chacune des lignées adipogéniques, ostéogéniques et neurales. Cette recherche conclue que l'action combinée de la multipotence des DPSCs avec les matrices en PLGA peut être employée dans l'ingénierie tissulaire de la régénération d'os, de tissu adipocyte, de tissu endodontique, de cartilage et de tissu nerveux (63).

- Etude de la genèse de kystes périapicaux

Les lésions périapicales sont fréquentes chez les adultes, avec une très forte prévalence des kystes radiculaires (60-75%). Leur expansion a des conséquences cliniques comme le déplacement des dents ou des fractures alvéolaires (77). Ces kystes radiculaires peuvent persister même après le retraitement canalaire (78). Comprendre le rôle des

facteurs biologiques dans la genèse de ces kystes est important pour l'amélioration des stratégies thérapeutiques de la biologie pulpaire.

Les mécanismes de la formation d'un kyste radiculaire et le rôle de son environnement (cellules épithéliales, le stroma, la matrice extracellulaire et l'os) sur sa croissance, son maintien et sa régression ne sont pas totalement compris. Il y a encore 2 théories qui subsistent pour expliquer la formation d'une cavité lors de l'inflammation péri-apicale. La première soutient que la nécrose au centre de l'îlot épithélial crée la cavité kystique (79), alors que la seconde, soutenue par Nair *et al* (2008) (80), présume que l'épithélium prolifère autour de l'inflammation initiale ou du foyer nécrotique.

Les connaissances sur les kystes radiculaires proviennent pour la plupart de descriptions à partir de biopsies (Guler *et al*, 2012)(81). Lors de ces observations, le kyste a déjà atteint un stade avancé, et ces études ne nous donnent pas d'informations sur le développement précoce.

L'équipe de Laureano *et al* (2019) a travaillé sur un modèle expérimental de la genèse kystique *in vitro* qui pourrait tester ces théories et étudier les effets mécaniques de différents facteurs de croissance durant le développement du kyste et son maintien (82). L'issue finale est le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques.

Ils ont utilisé des sphéroïdes tumoraux dérivés de lignées épithéliales et les ont intégrés à des matrices de collagène en 3 dimensions afin de créer des cavités kystiques similaires à celles observées *in vivo*. En recréant le microenvironnement des kystes, ce modèle expérimental mime la morphologie microscopique et les caractéristiques des kystes cliniques, comme l'organisation structurale.

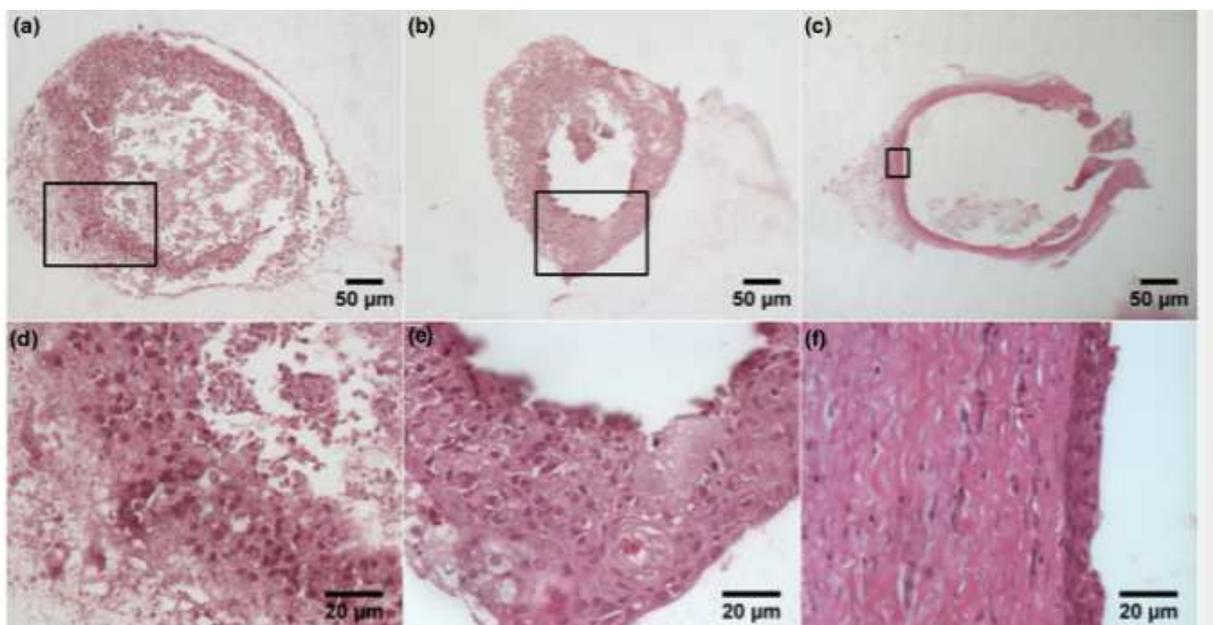


Figure 26: Microphotographie de la cavité kystique formée grâce aux sphéroïdes en 3D dans une matrice en collagène au bout de 3 jours. On observe une cavité à 3 jours (a) et 5 jours (b) avec une lignée épithéliale et une morphologie similaire aux kystes radiculaires de l'Homme (c). a, b et c, montrent de nombreuses couches de cellules épithéliales.

En revanche, ce modèle diffère de la situation clinique par l'absence des responsables de l'apparition d'un kyste radiculaire : l'inflammation et les cellules impliquées dans l'inflammation. L'équipe de Laureano soutient que ces éléments seront rajoutés directement dans le système *in vitro* lors des prochaines étapes de développement de ce modèle en 3 dimensions.

L'utilisation de modèles en 3 dimensions pourra être utilisé pour évaluer les différentes étapes du maintien du kyste dans le temps et tester de nouvelles thérapeutiques pour les réduire.

3) Le modèle expérimental Tooth slice

Les avancées de l'ingénierie tissulaire et de la biologie des cellules souches ont amené de nouvelles stratégies pour la régénération pulpaire. Quelques modèles expérimentaux pré-cliniques sont disponibles pour les études du mécanisme de la régénération de la pulpe dentaire chez l'homme : le modèle tooth slice / scaffold en fait partie. Ils utilisent le pôle de cellules souches d'origine dentaire en espérant les différencier en cellules pulpaires pour régénérer les tissus.

Jusqu'à présent, les études pour comprendre ce mécanisme de différenciation demandaient une approche *in vitro* puis une recherche *in vivo* afin de valider les résultats. De plus, utiliser une pulpe humaine serait idéal pour la prédictibilité des expériences.

a. Développement du modèle Tooth Slice

L'ébauche du modèle Tooth slice a vu le jour grâce à l'étude de Sloan et al en 1998, qui cherchait un nouveau modèle expérimental afin d'étudier le complexe pulpaire.

Pour ce faire, ils ont coupé des tranches de dents à partir d'incisives de rats et ont réussi à maintenir *in vitro* leur viabilité pendant 14 jours dans des boîtes de Petri. Durant cette période, le complexe dentino-pulpaire était viable. La morphologie et l'organisation du tissu pulpaire étaient préservés. Des observations au microscope ont prouvé que le phénotype et la viabilité des odontoblastes étaient également maintenus tout au long de la culture, à 2, 5, 7 et 14 jours (83). De plus, les résultats des radiographies montrent une sécrétion et une synthèse continue des composants de la matrice extra-cellulaire par les odontoblastes (83).

Près de 10 ans plus tard, une équipe de chercheurs, Gonçalves et al, a voulu utiliser la méthode de Sloan pour étudier l'angiogénèse *in vitro*. Après prélèvement de tranches de dents, ils les ont implantées de manière sous-cutanée chez une souris immunodéficiente pour déterminer si une pulpe dentaire humaine pouvait garder sa viabilité chez un hôte animal pendant au moins 7 jours. On peut déjà noter qu'ils ont utilisé des dents de sagesse humaines contrairement à Sloan qui avait utilisé des incisives d'origine animale. Le parallèle des résultats avec la réalité clinique est plus fiable.

Cette étude a montré la présence de vaisseaux sanguins fonctionnels dans la chambre pulpaire des tranches de dents implantées plusieurs jours chez la souris. Cela suggère que les vaisseaux sanguins existants ont été capables de s'anastomoser avec le système circulatoire de l'hôte pour rétablir l'apport d'oxygène et de nutriments. Grâce à cette circulation sanguine, les cellules et tissus pulpaires sont restés viables et peuvent communiquer entre eux, comme ils le faisaient en bouche (84).

b. Le modèle Tooth Slice/Scaffold

Plus récemment en 2011, une équipe a cherché à développer un modèle d'étude permettant l'étude translationnelle de la régénération de la pulpe dentaire Humaine : ils ont créé le Tooth Slice/Scaffold Model (85). Cette dénomination fait part de la combinaison entre une tranche de dent et un échafaudage ou matrice dans le cadre de l'ingénierie tissulaire de la pulpe dentaire. Sakai et al, se sont inspirés des recherches de leurs prédécesseurs Sloan (1998) et Gonçalves (2007).

Le concept de ce nouveau modèle est d'associer une tranche de dent avec l'ingénierie tissulaire. En effet, des cellules souches de la pulpe dentaire (DPSCs) vont êtreensemencées sur une matrice biodégradable qui sert d'échafaudage aux cellules pour s'auto-organiser en réseau et communiquer grâce à de nombreuses communications. Ce produit de l'ingénierie tissulaire est ensuite transplanté dans la chambre pulpaire de la tranche de dent. Une fois la tranche préparée, elle était implantée de manière sous-cutanée

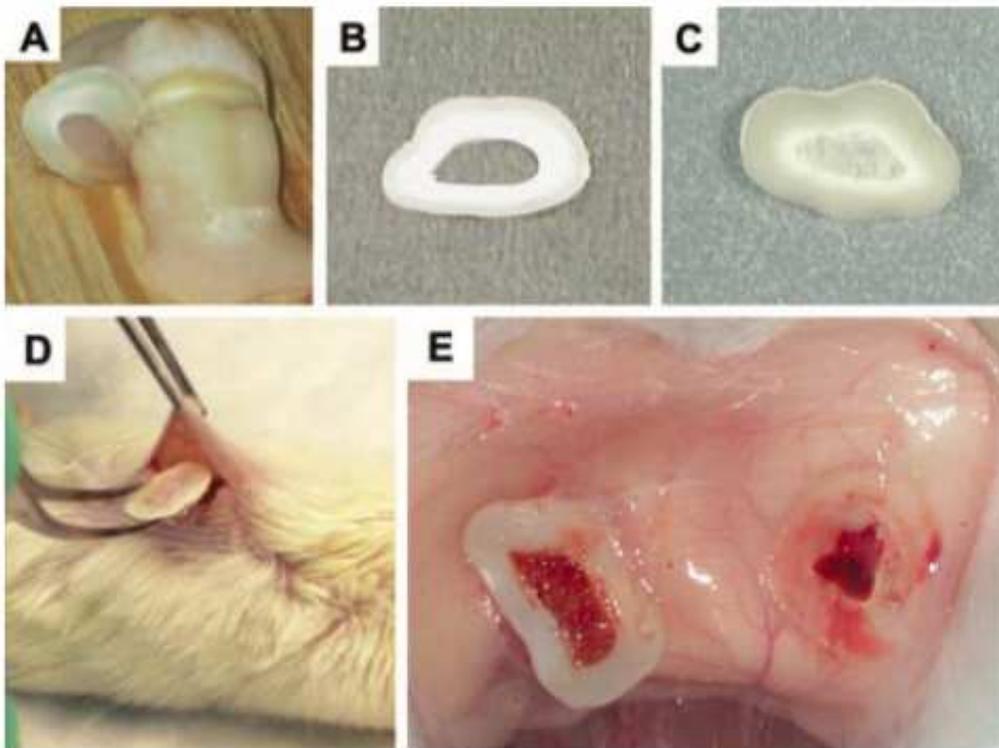


Figure 27 : Photographie du modèle expérimental d'ingénierie tissulaire tooth slice/ scaffold. (A) une tranche de dent d'1mm d'épaisseur est coupée dans la région cervicale d'une DDS non-cariée et humaine. (B) Tranche de dent après avoir ôté la cavité pulpaire. (C) Insertion d'une matrice PLLA hautement poreuse dans la tranche de dent. (D) Implantation de la tranche de dent de manière sous-cutanée chez une souris immunodéprimée, après ensemencement de DPSCs. (E) 3 semaines après implantation, on observe un tissu vascularisé dans la chambre pulpaire (69)

Cette étude a démontré que les DPSCs transplantées chez la souris se sont différenciées en des odontoblastes Humains et fonctionnels, capables de générer de la dentine, ainsi qu'en cellules vasculaires qui se sont auto-organisées pour créer des vaisseaux sanguins et s'anastomoser avec la vascularisation de l'hôte, permettant ainsi l'oxygénation et l'apport de nutriments aux cellules pulpaires.

Cette équipe a utilisé des dents de sagesse humaines. On note à nouveau l'usage d'animaux qui sont ensuite euthanasiés.

c. Applications du modèle Tooth slice/ Scaffold

Ces résultats montrent que le modèle Tooth Slice/ Scaffold est adapté pour des études translationnelles qui cherchent à comprendre le potentiel de différenciation des cellules souches dentaires. L'analyse des données suggère que les tissus pulpaires créés par ingénierie tissulaire pourront devenir une stratégie dans la revitalisation de dents immatures nécrosées.

Ce modèle est un outil intéressant dans le cadre de l'ingénierie tissulaire de la pulpe dentaire.

Il est adapté pour des études qui s'intéressent aux mécanismes impliqués dans la différenciation des cellules souches en odontoblastes et cellules endothéliales (86).

Par exemple, l'équipe de Cordeiro et al (2008), a utilisé le modèle tooth slice/scaffold afin d'évaluer les caractéristiques morphologiques d'un tissu formé après ensemencement de SHED (cellules souches issues de dents déciduales) sur une matrice intégrée dans une coupe de dent. En effet, l'utilisation de SHED pourrait apporter de nombreux avantages à l'ingénierie tissulaire par rapport aux cellules souches issues de dents permanentes : elles ont un taux de prolifération plus élevé et sont plus « accessibles » en conservant tout simplement des dents déciduales lors de l'exfoliation (87).

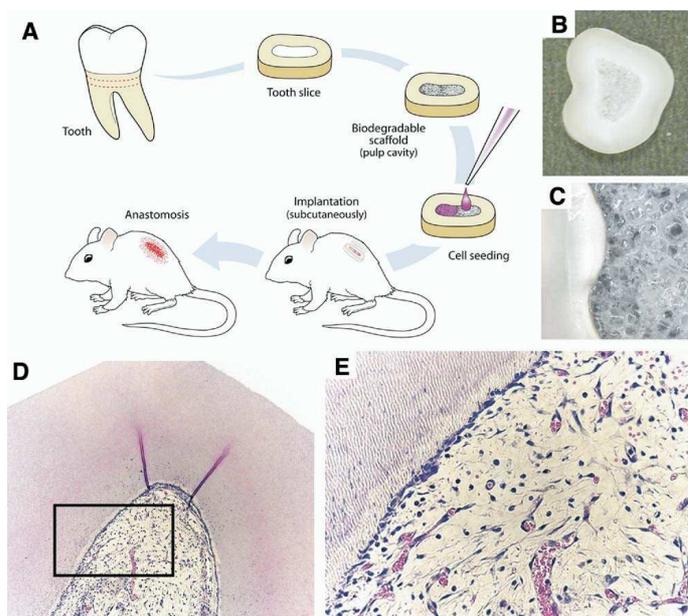


Figure 28 : Schéma du modèle tooth slice/scaffold utilisé. (B) Tranche de dent ensemencée de cellules souches dentaires et d'une matrice biodégradable. (C) Fort grossissement du modèle expérimental montrant la frontière entre la matrice et la pré-dentine. (D) Grossissement X100 de la pulpe dentaire formée après 14 jours d'implantation du modèle dans une souris immunodéficiente. (E) Fort grossissement X400 de la pulpe dentaire obtenue par ingénierie tissulaire et encadrée dans (D).

C'est donc grâce aux dents déciduales exfoliées que l'équipe de chercheurs a recueilli des cellules souches (SHED). Elle les a ensuite disposées dans des tranches de dents issues de dents de sagesse non cariées, mais contenant une matrice à base de polymères.

Cette étude conclue que les SHED ensemencées dans un modèle Tooth slice/scaffold sont capables de se différencier en odontoblastes et de former un réseau microvasculaire, ce qui constitue un prérequis à la réussite de l'ingénierie tissulaire de tissus et organes (88).

Par la suite, l'équipe de Sakai et al, en 2010, a pu démontrer que les SHED peuvent se différencier en cellules angiogéniques et odontoblastes, capables de générer de la dentine tubulaire (89).

Ce modèle permet la manipulation génétique *in vitro* des DPSC avant l'implantation chez la souris. Cela constitue une approche pour évaluer de manière relativement aisée les conséquences biologiques des changements d'expression des gènes sur le potentiel de différenciation des DPSCs.

Des équipes l'utilisent également afin de tester l'impact d'un design et de la composition d'une matrice sur la différenciation des DPSCs et la génération d'un tissu pulpaire (90).

De plus, le modèle tooth slice/scaffold dispose de caractéristiques qui améliorent la prédictibilité des études qui l'utilisent. En effet, il implique à la fois de la dentine Humaine et des cellules souches d'origine humaine pour créer un parallèle entre l'*in vitro* et la réalité biologique.

d. Un modèle en voie de développement

L'utilisation de ce modèle est prometteuse. En effet, comme vu précédemment, il permet d'utiliser des cellules humaines dans leur structure d'origine, et donc en conservant leur organisation en 3 dimensions.

Prenons l'exemple de Lynch et al et de l'étude de 2018 : *An ex-vivo model to determine dental pulp responses to heat and light-curing of dental restorative materials* (91).

Il est primordial de vérifier l'innocuité des lampes à photopolymériser lors de la réalisation de soins conservateurs en composite qui sont des actes courants. En effet, ces lampes induisent une élévation de la température. Cette recherche a pour but d'étudier les effets de cette hausse thermique sur la pulpe dentaire. Pour ce faire, elle a utilisé des tranches de dents maintenues dans un milieu de culture et les a exposées à la lumière des lampes.

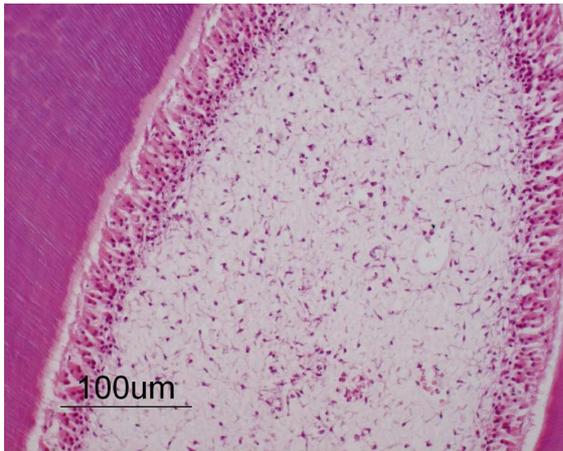


Figure 30 : Microphotographie de la coupe de pulpe témoin. Elle présente une pulpe saine et la morphologie des odontoblastes est normale

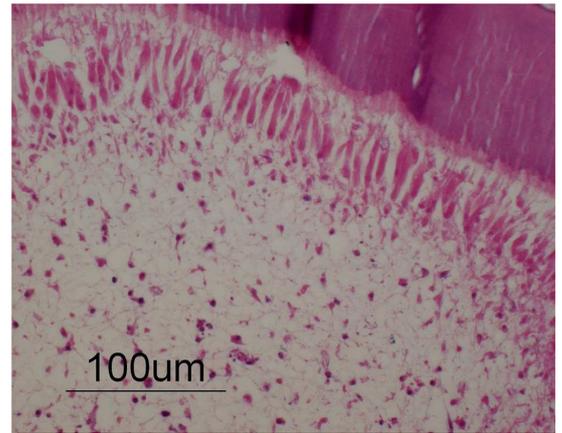


Figure 29: Photographie microscopique d'une coupe présentant la pulpe dentaire après application de la lampe photopolymérisable pendant 30 secondes. Les odontoblastes montrent des dégâts visibles dans la partie supérieure de la coupe. Grossissement x40

L'équipe faisait ensuite une étude histologique des tranches au microscope et a observé des dommages sur les odontoblastes.

Ce modèle *ex-vivo* de tooth slice offre de nombreux avantages pour comprendre le résultat de l'application d'une source de chaleur, et permet de réduire le nombre d'animaux sacrifiés en utilisant plusieurs tranches issues d'une même dent. De plus, il évite plusieurs biais de confusion lors du sacrifice animal, de l'extraction dentaire et le traumatisme de la coupe de la tranche de dent, et sur la viabilité et santé des tissus dentaires (91). Cela permet une compréhension plus pertinente des effets physiologiques et pathologiques de la chaleur sur le système dentinopulpaire.

Il faut désormais que les chercheurs arrivent à obtenir une angiogénèse qui maintient la pulpe vitale sans implantation de la tranche de dent chez une souris immunodéficente.

4) Les limites des structures organoïdes

Le développement et l'application des structures organoïdes sont prometteurs mais encore à leurs débuts. Ces structures suscitent une grande excitation mais afin que cette promesse biologique se transforme en réalité, il ne faut pas se précipiter. L'engouement crée des attentes surréalistes et des déceptions au niveau des délais annoncés. Il faut consolider les connaissances et protocoles, aller petit à petit et faire preuve d'une grande rigueur en faisant preuve d'autocritique.

Par ailleurs, les règles de bonne pratique et gold standards doivent être établis pour l'étude sur organoïdes. Les protocoles des conditions de culture doivent fournir suffisamment d'informations et de détails pour permettre à d'autres équipes de reproduire l'expérience (70). Les critères doivent être développés pour que les chercheurs puissent comparer les types et structures cellulaires d'un organoïde à la composition et organisation de l'organe clé.

C'est un challenge pour les années à venir qui va nécessiter des approfondissements avant de pouvoir se substituer aux modèles *in vivo*.

En effet, les organoïdes schématisent seulement une petite partie du corps humain et ils ne reproduisent pas de manière fidèle les fonctions complexes des organes. Par ailleurs, contrairement aux modèles animaux, les organoïdes offrent seulement une approximation biologique de l'organe et n'imitent pas le comportement de l'organisme dans sa totalité. Ils manquent des caractéristiques de l'*in vivo* telles qu'un réseau physiologique complet ou un système immunitaire fonctionnel. C'est pourquoi les résultats issus d'organoïdes ont besoin d'être complétés par des études sur des modèles expérimentaux *in vivo* qui ont un organisme complet, et comparées au développement, l'organisation tissulaire et la physiologie réelle (70).

La création et la manipulation des organoïdes est plus fastidieuse et coûteuse que les cultures en 2 dimensions. De plus, la plupart des facteurs de croissance sont encore très chers et ne sont pas testés spécifiquement pour une telle utilisation. B. Artegiani, chercheuse à l'université d'Utrecht (Pays-Bas), soutient que l'évolution sera rapide et que les banques cellulaires vont s'adapter. D'après elle, beaucoup d'industries ont déjà commencé à commercialiser des réactifs adaptés aux cultures de structures organoïdes (60).

Il est difficile d'assurer la maintenance au long terme des modèles en 3 dimensions et il est souvent nécessaire de les mettre en culture avec des substances dérivées de l'organe en question et recréer des vaisseaux sanguins afin de garder la vitalité de l'organoïde. C'est le cas lors de certaines expériences avec tooth slice où la tranche de dent était implantée chez l'animal pour garantir une angiogénèse. Ce point est une limite par rapport à l'utilisation d'animaux et les études à venir doivent y trouver une solution (42).

De plus, lors de l'utilisation de cellules issues de patient, il est nécessaire d'élaborer un consentement afin de conserver la confiance du public en l'intégrité des études médicales. Ce consentement devrait spécifier qu'il autorise le partage de l'échantillon entre

différents institutions et équipes de recherche (70). Dans le cadre de recherches sur la biologie pulpaire, nous avons la chance d'avoir une source de cellules souches à disposition de manière aisée : les dents de sagesse. Avant l'intervention, on peut faire signer ce consentement aux jeunes patients (si mineurs, demander autorisation parentale) afin de récupérer la dent extraite et saine qui fournira de nombreuses cellules.

Pour finir, le modèle Tooth slice est très utile pour la biologie pulpaire, en particulier quand il est associé à des cellules souches. En revanche, il nécessite pour l'instant une implantation chez l'animal afin de créer une anastomose entre les vaisseaux de l'hôte et de la pulpe dentaire. Même si plusieurs greffons peuvent être implantés chez un même rat et donc contribuer à la réduction du nombre d'animaux nécessaire, il serait important de trouver un moyen de maintenir une vitalité sans euthanasie.

V. Conclusion

La recherche *in vitro* apporte des renseignements sur la compréhension des réactions face aux biomatériaux et sur la compréhension des mécanismes physiologiques à l'échelle d'une cellule ou d'un tissu. Ainsi, il est possible de mesurer différents paramètres tels que la cytotoxicité, la génotoxicité. Néanmoins, ce modèle d'étude nécessite une grande rigueur expérimentale et n'est pas prédictif des réactions générales du corps humain car il est difficile de modéliser un système vasculaire, nerveux ou lymphatique.

Dans le cadre de la biologie pulpaire, la recherche *in vitro* permet de consolider nos connaissances sur les cellules constituant les tissus dentaires et pulpaires, et en particulier l'étude du potentiel des cellules souches d'origine dentaire. Elle est également utilisée pour tester de nouveaux biomatériaux ou des molécules dites « bioactives ».

Envisagée généralement à la suite de l'expérimentation sur les cellules mais précédant les essais cliniques, la recherche *in vivo* permet de tester les connaissances acquises en laboratoire sur des modèles animaux. Les animaux sont utilisés pour la compréhension de la physio-pathologie, et servent de cobayes aux essais secondaires. En revanche, la prédictibilité sur l'Homme est limitée. Il n'existe pas de modèle animal parfait et proche de l'Homme à tous les égards. De plus, il est difficile de reproduire les pathologies humaines telles que les caries dentaires ou l'inflammation pulpaire. Enfin, l'expérimentation animale engendre de nombreux débats sur l'éthique.

Bien que de nouvelles réglementations tentent de réguler l'utilisation des animaux, il existe un besoin urgent de trouver une alternative expérimentale.

Les modèles organoïdes ont été développés pour étudier les conditions de développement physiologiques et pathologiques de tissus, organes et pathologies. Leur utilisation et développement réduit de manière significative le nombre d'animaux requis pour les expérimentations *in vivo*. Les modèles organoïdes ont permis par exemple de comprendre le développement lors des phases fœtales, la détermination de défauts. De plus, les modèles organoïdes ont du potentiel pour la recherche toxicologique et pharmacologique afin de s'affranchir d'études *in vivo*. Ainsi, les modèles organoïdes, tendent à se développer dans tous les domaines de la recherche et notamment en cancérologie.

Les cultures organoïdes combinées aux progrès dans l'ingénierie tissulaire ouvrent de belles perspectives pour la médecine personnalisée, c'est-à-dire développée sur-mesure au patient. En 2020, les médecins-chercheurs du centre de lutte contre le cancer Gustave Roussy à Paris, vont procéder à un essai clinique de médecine personnalisée qui s'appuie sur les organoïdes. L'objectif est de créer une tumeur en culture à partir des cellules tumorales prélevées au patient. Des médicaments de chimiothérapie conventionnelle ou thérapie ciblée seront testés sur les organoïdes afin de trouver le traitement le plus adapté et le plus efficace au malade cible. Si l'essai s'avère concluant, cette procédure pourrait être étendue aux malades en échec de traitement standard en cancérologie comme dans tous les domaines médicaux (92).

Le développement de tels modèles expérimentaux permet de mesurer et schématiser la réponse biologique de la dentine et pulpe lors de sa régénération. Ainsi, il est

possible de mesurer les réponses moléculaires et cellulaires et de comprendre comment les tissus répondent aux agressions tissulaires, au vieillissement ou face aux biomatériaux. Ils donnent la possibilité d'appréhender la complexité du processus de régénération naturelle de ces tissus et de pouvoir moduler différents processus impliqués dans la régénération pulpaire. L'objectif final étant le développement de nouveaux traitements cliniques. C'est un outil puissant pour avancer dans le développement de nouvelles stratégies de régénération tissulaire et la création de nouveaux protocoles avec des traitements bioactifs (39).

Néanmoins, la recherche sur les organoïdes ne se substitue pas totalement pour le moment à l'expérimentation *in vivo* et doit être utilisée comme un outil complémentaire aux études existantes.

VI. Bibliographie

1. Ravi M, Paramesh V, Kaviya SR, Anuradha E, Solomon FDP. 3D Cell Culture Systems: advantages and applications. *J Cell Physiol*. 2015 Jan;230(1):16–26.
2. Horizon. 5 tips for choosing the right cell line for your experiment. <https://blog.horizondiscovery.com/5-tips-for-choosing-the-right-cell-line-for-your-experiment>.
3. Thermo Fisher Scientific. Selecting the appropriate cell line <https://www.thermofisher.com/fr/fr/home/references/gibco-cell-culture-basics/cell-lines.html>
4. Barlovatz-Meimon Georgia. Culture de cellules animales. Volume 1. 3ème éd. Paris: Lavoisier; 2014.
5. Werle SB, Chagastelles P, Pranke P, Casagrande L. The effects of hypoxia on in vitro culture of dental-derived stem cells. *Arch Oral Biol*. 2016 Aug;68(n°):13–20.
6. Comité éthique du CNRS. Pratiquer une recherche intègre et responsable: guide. 2017.
7. Shpichka A, Butnaru D, Bezrukov EA, Sukhanov RB, Atala A, Burdukovskii V, et al. Skin tissue regeneration for burn injury. *Stem Cell Res Ther*. 2019 Dec;10(1):94.
8. Bulbule AM MP. In vitro evaluation of cytotoxicity of *Embllica officinalis* (amla) on cultured human primary dental pulp fibroblasts. *J Indian Soc Pedod Prev Dent*. 2019 Dec;37(3):251–7.
9. Société Francophone de Biomatériaux Dentaires. Notions de biocompatibilité. 2009 2010;13. <http://campus.cerimes.fr/odontologie/enseignement/chap7/site/html/cours.pdf>
10. Jiang RD, Lin H, Zheng G, Zhang XM, Du Q, Yang M. In vitro dentin barrier cytotoxicity testing of some dental restorative materials. *J Dent*. 2017 Mar;58(n°):28–33.
11. Schweikl H, Schmalz G. Toxicity parameters for cytotoxicity testing of dental materials in two different mammalian cell lines. *Eur J Oral Sci*. 1996 Jun;104(3):292–9.
12. Marieb N. E. Anatomie et physiologie humaines. Edition du Renouveau pédagogique ; 2010.
13. Hayflick L, Moorhead PS. The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp Cell Res*. 1961 Dec;25(3):585–621.
14. Collège Français des Pathologistes. Cellule cancéreuse et tissu cancéreux. 2011.
15. Lycée Etienne Oehmichen Fiche technique. Les microscopes optiques et électroniques.

https://lycee-etienne-oehmichen.fr/contenu/discipline/svt/01_Pour_Observation2/Les_types_de_microscopes.pdf.

16. Betzig E., Hell W. S. How the optical microscope became a nanoscope. <https://www.nobelprize.org/uploads/2018/06/popular-chemistryprize2014.pdf>
17. Pawley JB. Handbook of biological confocal microscopy. London: Plenum Press; 1990.
18. m2osw. La microscopie optique (ou phototonique): Principales caractéristiques des microscopes optiques. <https://bio.m2osw.com/gcartable/micrconfoc.htm>.
19. Ruste J. Microscopie électronique à balayage- Principe et équipement. Tech Ing. 2013 Mar 10; p865
20. Conseil dentaire, Dr Hauteville A. L'histologie en odontostomatologie. <https://conseildentaire.com/lhistologie-en-odontostomatologie/>.
21. Abbas A, Lichtman A. Cellular and molecular immunology. 7th ed. Philadelphia: Elsevier Sanders; 2012.
22. Bruno KF, Silva JA, Silva TA, Batista AC, Alencar AHG, Estrela C. Characterization of inflammatory cell infiltrate in human dental pulpitis: immunological aspects of dental pulpitis. Int Endod J. 2010 Nov;43(11):1013–21.
23. Seltzer S, Bender IB, Ziontz M. The dynamics of pulp inflammation: correlations between diagnostic data and actual histologic findings in the pulp. Oral Surg Oral Med Oral Pathol. 1963 Jul 1;16(7):846–71.
24. Simon C. Pulp biology: understanding in daily practice. Rev Odonto-Stomatol. 2008 Jun ;(37):209–35.
25. Accorinte M de LR, Holland R, Reis A, Bortoluzzi MC, Murata SS, Dezan E, et al. Evaluation of mineral trioxide aggregate and calcium hydroxide cement as pulp-capping agents in human teeth. J Endod. 2008 Jan ;34(1):1–6.
26. Techniques de l'ingénieur, Lao J, Nedelec JM. Bioactivité. Verres bioactifs. <https://www.techniques-ingenieur.fr/base-documentaire/materiaux-th11/sciences-et-technologies-du-verre-42573210/verres-bioactifs-n4955/bioactivite-n4955niv10001.html>.
27. Adıgüzel M, Ahmetoğlu F, Ünverdi Eldeniz A, Tekin MG, Göğebakan B. Comparison of cytotoxic effects of calcium silicate-based materials on human pulp fibroblasts. J Dent Res Dent Clin Dent Prospects. 2019 Dec ;13(4):241–6.
28. Jing-yi LI SW Yan-mei DONG. Anti-inflammatory and repaired effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs on human dental pulp cells. J Peking Univ Sci. 2020 Feb ;52(1):24–9.
29. Siqueira JF, Rôças IN. Clinical implications and microbiology of bacterial

persistence after treatment procedures. *J Endod.* 2008 Nov 1;34(11):1291-1301.e3.

30. McGurkin-Smith R, Trope M, Caplan D, Sigurdsson A. Reduction of Intracanal Bacteria Using GT Rotary Instrumentation, 5.25% NaOCl, EDTA, and Ca(OH)₂. *J Endod.* 2005 May ;31(5):359–63.

31. Zeng C, Willison J, Meghil MM, Bergeron BE, Cutler CW, Tay FR, et al. Antibacterial efficacy of an endodontic sonic-powered irrigation system: An in vitro study. *J Dent.* 2018 Aug;75(n°):105–12.

32. Renard E, Lopez-Cazaux S, Guicheux J, Weiss P, Laboux O, Alliot-Licht B. Les cellules souches de la pulpe dentaire. *C R Biol.* 2007 Sep;330(9):635–43.

33. Saito MT. Tooth-derived stem cells: Update and perspectives. *World J Stem Cells.* 2015;7(2):399.

34. Egusa H, Sonoyama W, Nishimura M, Atsuta I, Akiyama K. Stem cells in dentistry – Part I: Stem cell sources. *J Prosthodont Res.* 2012 Jul;56(3):151–65.

35. Ferro F, Spelat R, Beltrami AP, Cesselli D, Curcio F. Isolation and characterization of human dental pulp derived stem cells by using media containing Low Human Serum Percentage as Clinical Grade Substitutes for Bovine Serum. *PLoS ONE.* 2012 Nov ;7(11):e48945.

36. Casanova L, Hughes FJ, Preshaw PM. Diabetes and periodontal disease: a two-way relationship. *Br Dent J.* 2014 Oct;217(8):433–7.

37. Steindorff MM, Lehl H, Winkel A, Stiesch M. Innovative approaches to regenerate teeth by tissue engineering. *Arch Oral Biol.* 2014 Feb;59(2):158–66.

38. Struillou X, Boutigny H, Soueidan A, Layrolle P. Experimental animal models in periodontology: a review. *Open Dent J.* 2010 Apr 29;4(1):37–47.

39. Sloan AJ, Lynch CD. Dental Tissue Repair: Novel models for tissue regeneration strategies. *Open Dent J.* 2012 Dec 28;6(1):214–9.

40. Nagendrababu V, Kishen A, Murray PE, Nekoofar MH, Figueiredo JAP, Priya E, et al. Preferred reporting items for animal studies in endodontology: a development protocol. *Int Endod J.* 2019 Sep;52(9):1290–6.

41. Bowen WH. Rodent model in caries research. *Odontology.* 2013 Jan;101(1):9–14.

42. Kojima H. The Use of 3-D Models as alternatives to animal testing. *Altern Lab Anim.* 2015 Sep;43(4):P40–3.

43. Gori GB. Animals and ethical research. *Regul Toxicol Pharmacol.* 2014 Dec;70(3):575–6.

44. Richmond J. The 3Rs – Past, present and future. *27(2):9.*

45. Festing MFW, Baumans V, Combes RD, Hendriksen CFM, Howard BR, Moore GJ, et al. Reducing the use of laboratory animals in biomedical research: problems and possible Solutions. *Altern Lab Anim* 1998 May-Jun; 26(n°) 283-301
46. Flecknell PA. Refinement of animal use- assessment and alleviation of pain and distress. *Lab Anim*. 1994;28(n°):222–31.
47. Prescott RS, Alsanea R, Fayad MI, Johnson BR, Wenckus CS, Hao J, et al. In vivo generation of dental pulp-like tissue by using dental pulp stem cells, a collagen scaffold, and dentin matrix protein 1 after Subcutaneous Transplantation in Mice. *J Endod*. 2008 Apr;34(4):421–6.
48. Nör JE, Peters MC, Christensen JB, Sutorik MM, Linn S, Khan MK, et al. Engineering and characterization of functional human microvessels in immunodeficient mice. *Lab Invest*. 2001 Apr;81(4):453–63.
49. Ruangsawasdi N, Zehnder M, Patcas R, Ghayor C, Weber FE. Regenerative dentistry: animal model for regenerative endodontology. *Transfus Med Hemother*. 2016;43(5):359–64.
50. Brehm MA, Cuthbert A, Yang C, Miller DM, DiIorio P, Laning J, et al. Parameters for establishing humanized mouse models to study human immunity: Analysis of human hematopoietic stem cell engraftment in three immunodeficient strains of mice bearing the IL2rynull mutation. *Clin Immunol*. 2010 Apr;135(1):84–98.
51. Naveilhan A. Comparaison des modèles in vivo utilisés pour l'étude de la régénération pulpaire au travers d'une revue de la littérature. (Thèse d'exercice). (Bordeaux, France): Université de Bordeaux. Unité de Formation et de Recherche d'Odontologie; 2017.
52. Catros S, Ziane S, Lalande C, Arnault I, Rousseau B, Miraux S, et al. Méthodes d'imagerie in vivo sur le petit animal : intérêt en ingénierie tissulaire osseuse. 56ème Congrès de la SFMBCB [Internet]. Nîmes, France: EDP Sciences; 2011 [cited 2020 Jan 27]. Available from: <http://www.sfco-congres.org/10.1051/sfmbcb/20115603014>
53. Torabinejad M, Corr R, Buhrlay M, Wright K, Shabahang S. An Animal Model to Study Regenerative Endodontics. *J Endod*. 2011 Feb;37(2):197–202.
54. A. Sivaraman, J. K. Leach, S. Townsend, T. Iida, B. J. Hogan, D. B. Stolz, et al. A microscale in vitro physiological model of the liver: predictive screens for drug metabolism and enzyme induction. *Curr Drug Metab*. 2005;6(6):569–91.
55. Schmeichel KL. Modeling tissue-specific signaling and organ function in three dimensions. *J Cell Sci*. 2003 Jun 15;116(12):2377–88.
56. Galzi J-L, Jouault T, Amédée J. Les organoïdes : des mini-organes au service de la biomédecine. *Med Sci* 2019 May;35(5):467–9.
57. Takebe T. Organoids by design. *Science*. 2019 Jun 9;364:956–60.

58. Watanabe M, Buth JE, Vishlaghi N, de la Torre-Ubieta L, Taxidis J, Khakh BS, et al. self-organized cerebral organoids with human-specific features predict effective drugs to combat zika virus infection. *Cell Rep.* 2017 Oct;21(2):517–32.
59. Drost J, Clevers H. Organoids in cancer research. *Nat Rev Cancer.* 2018 Jul ;18(7):407–18.
60. Artegiani B, Clevers H. Use and application of 3D-organoid technology. *Hum Mol Genet.* 2018 Aug 1;27(R2):R99–107.
61. McCauley HA, Wells JM. Pluripotent stem cell-derived organoids: using principles of developmental biology to grow human tissues in a dish. *Development.* 2017 Mar ;144(6):958–62.
62. Li Y, He L, Pan S, Zhang L, Zhang W, Yi H, et al. Three-dimensional simulated microgravity culture improves the proliferation and odontogenic differentiation of dental pulp stem cell in PLGA scaffolds implanted in mice. *Mol Med Rep.* 2017 Mar;15(2):873–8.
63. Bhuptani RS, Patravale VB. Porous microscaffolds for 3D culture of dental pulp mesenchymal stem cells. *Int J Pharm.* 2016 Dec;515(1–2):555–64.
64. Riss T. Overview of 3D cell culture model systems & validating cell-based assays for use with 3D cultures.
<https://france.promega.com/resources/webinars/worldwide/archive/overview-of-3d-cell-culture-model-systems/>
65. Vilos C, Velasquez LA. Therapeutic strategies based on polymeric microparticles. *J Biomed Biotechnol.* 2012;2012:1–9.
66. Zhang W, Frank Walboomers X, van Kuppevelt TH, Daamen WF, Bian Z, Jansen JA. The performance of human dental pulp stem cells on different three-dimensional scaffold materials. *Biomaterials.* 2006 Nov;27(33):5658–68.
67. Hajime K. The use of 3-D models as alternatives to animal testing. *ATLA.* 2015;43:40–3.
68. Bercu MM, Arien-Zakay H, Stoler D, Lecht S, Lelkes PI, Samuel S, et al. Enhanced survival and neurite network formation of human umbilical cord blood neuronal progenitors in three-dimensional collagen constructs. *J Mol Neurosci.* 2013 Oct 1;51(2):249–61.
69. Vinci M, Gowan S, Boxall F, Patterson L, Zimmermann M, Court W, et al. Advances in establishment and analysis of three-dimensional tumor spheroid-based functional assays for target validation and drug evaluation. *BMC Biol.* 2012 Mar;10:29–29.
70. Lehmann R, Lee CM, Shugart EC, Benedetti M, Charo RA, Gartner Z, et al. Human organoids: a new dimension in cell biology. *Mol Biol Cell.* 2019 May;30(10):1129–37.

71. Jian Liu, Abate W, Jinsheng Xu, Corry D, Kaul B, Jackson SK. Three-dimensional spheroid cultures of A549 and HepG2 cells exhibit different lipopolysaccharide (LPS) receptor expression and LPS-induced cytokine response compared with monolayer cultures. *Innate Immun.* 2011 Jun;17(3):245–55.
72. Mueller-Klieser W. Three-dimensional cell cultures: from molecular mechanisms to clinical applications. *Am J Physiol-Cell Physiol.* 1997 Oct ;273(4):C1109–23.
73. Mazzoleni G, Di Lorenzo D, Steimberg N. Modelling tissues in 3D: the next future of pharmaco-toxicology and food research? *Genes Nutr.* 2009 Mar;4(1):13–22.
74. Gabriel E, Ramani A, Karow U, Gottardo M, Natarajan K, Gooi LM, et al. Recent zika virus isolates induce premature differentiation of neural progenitors in human brain organoids. *Cell Stem Cell.* 2017 Mar;20(3):397-406.e5.
75. Rosowski J, Bräunig J, Amler A-K, Strietzel FP, Lauster R, Rosowski M. Emulating the early phases of human tooth development in vitro. *Sci Rep.* 2019 Dec;9(1):7057.
76. Kabir R, Gupta M, Aggarwal A, Sharma D, Sarin A, Kola MZ. Imperative role of dental pulp stem cells in regenerative therapies: a systematic review. *Niger J Surg O.* 2014 Jan;20(1):1–8.
77. Ward J. A mathematical model of the dynamics of odontogenic cyst growth. *Anal Quant Cytol Histol.* 2004 Feb;26(1):39–46.
78. Signoretti FGC, Endo MS, Gomes BPPA, Montagner F, Tosello FB, Jacinto RC. Persistent extraradicular infection in root-filled asymptomatic human tooth: scanning electron microscopic analysis and microbial investigation after apical microsurgery. *J Endod.* 2011 Dec 1;37(12):1696–700.
79. Toller PA. The osmolality of fluids from cysts of the jaws. *Br Dent J.* 1970 Sep ;129(6):275–8.
80. Nair PNR, Sundqvist G, Sjögren U. Experimental evidence supports the abscess theory of development of radicular cysts. *Oral Surg Oral Med Oral Radiol Endod.* 2008 Aug 1;106(2):294–303.
81. Güler N, Çomunoğlu N, Cabbar F. Ki-67 and MCM-2 in dental follicle and odontogenic cysts: the effects of inflammation on proliferative markers.. *Sci World J.* 2012 Jun ;2012:946060.
82. Laureano NK, Bernardi L, Bundrich L, Brand LM, Visioli F, Lamers ML, et al. Development of an *in vitro* model to study tooth cystogenesis. *Int Endod J.* 2019 Dec;52(12):1750–7.
83. Sloan AJ, Shelton RM, Hann AC, Moxham BJ, Smith AJ. An in vitro approach for the study of dentinogenesis by organ culture of the dentine–pulp complex from rat incisor teeth. *Arch Oral Biol.* 1998 Jun;43(6):421–30.

84. Goncalves S, Dong Z, Bramante C, Holland G, Smith A, Nor J. Tooth slice-based models for the study of human dental pulp angiogenesis. *J Endod.* 2007 Jul;33(7):811–4.
85. Sakai VT, Cordeiro MM, Dong Z, Zhang Z, Zeitlin BD, Nör JE. Tooth slice/scaffold model of dental pulp tissue engineering. *Adv Dent Res.* 2011 Jul;23(3):325–32.
86. Casagrande L, Demarco FF, Zhang Z, Araujo FB, Shi S, Nör JE. Dentin-derived BMP-2 and odontoblast differentiation. *J Dent Res.* 2010 Jun;89(6):603–8.
87. Martinez Saez D, Sasaki RT, Neves A d. C, da Silva MCP. Stem cells from human exfoliated deciduous teeth: a growing literature. *Cells Tissues Organs.* 2016;202(5–6):269–80.
88. Cordeiro MM, Dong Z, Kaneko T, Zhang Z, Miyazawa M, Shi S, et al. Dental Pulp Tissue Engineering with Stem Cells from Exfoliated Deciduous Teeth. *J Endod.* 2008 Aug;34(8):962–9.
89. Sakai VT, Zhang Z, Dong Z, Neiva KG, Machado MAAM, Shi S, et al. SHED Differentiate into Functional Odontoblasts and Endothelium. *J Dent Res.* 2010 Aug;89(8):791–6.
90. Demarco FF, Casagrande L, Zhang Z, Dong Z, Tarquinio SB, Zeitlin BD, et al. Effects of morphogen and scaffold porogen on the differentiation of dental pulp stem cells. *J Endod.* 2010 Nov;36(11):1805–11.
91. Lynch CD, Roberts JL, Al-Shehri A, Milward PJ, Sloan AJ. An ex-vivo model to determine dental pulp responses to heat and light-curing of dental restorative materials. *J Dent.* 2018 Dec;79(n°):11–8.
92. Jaulin F. Les organoïdes au secours des cancers digestifs. Communiqué de presse Mar 2, 2020.
<https://www.gustaveroussy.fr/sites/default/files/cp-mars-bleu-organoide-02032020.pdf>

PEPIN (Marion). – Les structures organoïdes appliquées à la biologie pulpaire. – 65 f. ; ill. ; 92 ref. ; 30 cm (Thèse : Chir. Dent. ; Nantes ; 2020)

RESUMÉ

Dans le cadre de la recherche fondamentale sur la biologie pulpaire, il est nécessaire de passer par des phases d'études *in vitro* et *in vivo* avant les essais cliniques chez l'Homme.

L'objectif de ce travail était de déterminer les avantages et les limites à l'utilisation en biologie pulpaire d'un nouveau modèle expérimental : les structures organoïdes.

La recherche *in vitro* a lieu en laboratoire et consiste à étudier des cultures cellulaires. En revanche, elle requiert une manipulation complexe et ne reflète pas la réalité biologique et clinique. C'est pour cela qu'elle est suivie d'une phase de recherche dans le vivant, *in vivo*, afin d'explorer la diversité des réponses de l'organisme. Les analyses sur animaux permettent une vision plus globale des mécanismes systémiques grâce aux interactions entre les organes. Néanmoins, la prédictibilité est limitée et les résultats ne sont jamais complètement transposables à l'Homme. De plus, l'expérimentation chez l'animal soulève la question de l'éthique et rencontre de plus en plus d'opposition.

C'est dans ce contexte que les structures organoïdes ont vu le jour. Elles permettent de reproduire la structure d'un organe et miment au moins l'une de ses fonctions. Ce sont des structures en 3 dimensions et multicellulaires qui peuvent provenir d'un organe ou de cellules souches.

En biologie pulpaire, les cultures de cellules en 3 dimensions, permettent d'approfondir nos connaissances sur l'odontogénèse en recréant les étapes précoces du processus, et d'utiliser pleinement le potentiel de multipotence des cellules souches d'origine dentaire.

Le modèle expérimental Tooth Slice, quant à lui, est un organoïde sous forme de tranche de dent. Il offre un support à l'ingénierie tissulaire très intéressant par sa structure issue directement de l'organe cible.

Le développement et l'utilisation des structures organoïdes en biologie pulpaire en sont au commencement. Elles nécessitent encore un approfondissement des protocoles et de la compréhension des mécanismes mis en œuvre.

En conclusion, les organoïdes ne se substituent pas à l'expérimentation *in vivo* et doivent être considérés comme un outil complémentaire aux études existantes.

RUBRIQUE DE CLASSEMENT : Dentisterie conservatrice

MOTS CLES MESH

Organoïdes- organoids

Techniques de culture cellulaire - cell culture techniques

Cellules souches – Stem cells

Biologie – Biology

Pulpe dentaire – dental pulp

JURY

Président : Professeur Pérez F.

Directeur : Docteur Gaudin A.

Assesseur : Professeur Badran Z.

Assesseur : Docteur Huguet G.

ADRESSE DE L'AUTEUR

9 rue des récollets – 44200 NANTES
marion-pepin@orange.fr