



HAL
open science

Cellule souche gingivale : origine et multipotence

Ludwig Loison-Robert

► **To cite this version:**

Ludwig Loison-Robert. Cellule souche gingivale : origine et multipotence. Médecine humaine et pathologie. Université Paris-Est, 2016. Français. NNT : 2016PESC0083 . tel-01559542

HAL Id: tel-01559542

<https://theses.hal.science/tel-01559542>

Submitted on 10 Jul 2017

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UNIVERSITE PARIS EST

ECOLE DOCTORALE SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE

THESE

Pour le

DIPLOME DE DOCTEUR

EN SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE

Spécialité

PHYSIOLOGIE ET PHYSIOPATHOLOGIE

Monsieur LOISON-ROBERT Ludwig S.

“ Cellules souches gingivales : Origine et Multipotence ”

Thèse dirigée par **Mr le Docteur Benjamin P. FOURNIER** et **Mr le Professeur Bruno GOGLY**

Soutenue le 15 Décembre 2016

JURY

Mme. le Professeure Catherine Chaussain	Examineur
Mr. le Professeur Bruno Gogly	Co-Directeur de thèse
Mr. le Docteur Benjamin Fournier	Co-Directeur de thèse
Mr. le Docteur Jean-Pierre Attal	Rapporteur
Mme. le Docteur Sophie Creuzet	Rapporteur

REMERCIEMENTS

A Madame le Professeure Catherine Chaussain,

Professeur des Universités-Praticien Hospitalier, Université Paris-Descartes,

D'avoir accepté de participer à ce jury en tant qu'examineur.

A Madame le Docteur Sophie Creuzet

Chargée de Recherche

D'avoir accepté de participer à ce jury en tant que rapporteur.

A Monsieur le Docteur Jean-Pierre Attal

Maître de conférences des Universités-Praticien Hospitalier, Université Paris-Descartes.

D'avoir accepté de participer à ce jury en tant que rapporteur.

A Monsieur le Professeur Bruno Gogly,

Professeur des Universités-Praticien Hospitalier, Université Paris Descartes,

D'avoir dirigé ma thèse d'université. Veuillez recevoir toute ma gratitude

A Monsieur le Docteur Benjamin Fournier,

Maître de conférences des Universités-Praticien Hospitalier, Université Paris-Diderot.

D'avoir dirigé ma thèse d'université. Veuillez recevoir toute ma gratitude

Je n'ai pas échoué mille fois,
J'ai simplement découvert mille façons de ne pas faire une ampoule électrique.

Thomas EDISON

SOMMAIRE

INTRODUCTION GENERALE	9
CHAPITRE1 : PRESENTATION DU SUJET	11
1- LES CELLULES SOUCHES	11
GENERALITES	11
LES DIFFERENTS TYPES DE CELLULES SOUCHES	14
CELLULES SOUCHES EMBRYONNAIRES (CSE).....	14
CELLULES SOUCHES PLURIPOTENTES INDUITES (iPS ou iPSC).....	16
LES CELLULES SOUCHES ADULTES (CSA).....	17
CELLULES SOUCHES NON MESENCHYMATEUSES ADULTES	20
LES CELLULES SOUCHES STROMALES/MESENCHYMATEUSES (CSM)	20
HISTORIQUE	20
PRESENTATION.....	22
DEFINITION DE L'ISCT (INTERNATIONAL SOCIETY FOR CELLULAR THERAPY)	22
SOURCES TISSULAIRES	23
CARACTERISTIQUES <i>IN VITRO</i>	24
CARACTERISTIQUES <i>IN VIVO</i>	28
2- LES CELLULES STROMALES MESENCHYMATEUSES ISSUES DES TISSUS DE LA CAVITE ORALE	29
RAPPELS SUR LA MORPHOGENESE CRANIO-FACIALE ET L'ODONTOGENESE	29
LES DIFFERENTS TYPES DE CSM DE LA CAVITE ORALE	32
3- LES CSM DERIVEES DE LA GENCIVE OU CELLULES SOUCHES GINGIVALES (CSG)	34
LA GENCIVE	34
DEFINITION	35
COMPOSITION HISTOLOGIQUE.....	36
PROPRIETES DE CICATRISATION ET POTENTIEL THERAPEUTIQUE	36
LE FIBROBLASTE GINGIVAL	37
DEFINITION	37
RÔLE	39
ISOLATION.....	42

ORIGINE	46
HETEROGENEITE.....	47
LA CELLULE SOUCHE GINGIVALE	48
PRESENTATION.....	48
ISOLATION.....	48
ORIGINE	50
CLONOGENICITE ET SOUS-POPULATIONS	50
PLASTICITE ET MULTIPOTENCE	51
GENE DE PLURIPOTENCE	51
CHAPITRE2 : OBJECTIFS & STRATEGIES EXPERIMENTALES	53
CHAPITRE3 : RESULTATS	54
I ^{ère} PARTIE : ETUDE DE L'INFLUENCE DE LA METHODE D'ISOLATION DES FIBROBLASTES GINGIVAUX (GF) SUR L'OBTENTION DES CELLULES SOUCHES GINGIVALES HUMAINES (CSGH).....	54
OBJECTIFS	55
MATERIEL ET METHODE	55
RESULTATS	62
CONCLUSION.....	68
II ^{ème} PARTIE : ETUDE DE L'ORIGINE EMBRYOLOGIQUE DES FIBROBLASTES GINGIVAUX (GF) ET CELLULES SOUCHES GINGIVALES HUMAINES (CSGH).....	70
I- RÉSUMÉ DE L'ARTICLE: « CHARACTERISATION OF HUMAN GINGIVAL NEURAL CREST-DERIVED STEM CELLS IN MONOLAYER AND NEUROSPHERE CULTURES ».....	70
OBJECTIFS	71
RESULTATS	73
ARTICLE	73
III ^{ème} PARTIE : ETUDE ET CARACTERISATION DES SOUS-POPULATIONS DE CELLULES SOUCHES GINGIVALES HUMAINES (CSGH)	93
OBJECTIFS	93
MATERIEL ET METHODE	95
RESULTATS	102
DISCUSSION	114
CONCLUSION.....	118

IV ^{ème} PARTIE : ETUDE DE LA MULTIPOTENCE INDUITE POUR LES CELLULES SOUCHES GINGIVALES HUMAINES (CSGH)	119
OBJECTIFS	119
MATERIEL ET METHODE	120
RESULTATS	127
DISCUSSION	141
CONCLUSION.....	144
V ^{ème} PARTIE : EXEMPLE D'UTILISATION DES CELLULES SOUCHES ORALES EN BIOMATERIAUX.....	145
I- RÉSUMÉ DE L'ARTICLE: « EFFECTS OF HIGH-TEMPERATURE-PRESSUREPOLYMERIZED RESIN-INFILTRATED CERAMICNETWORKS ON ORAL STEM CELLS»	145
OBJECTIFS	147
RESULTATS	147
ARTICLE.....	148
I- RÉSUMÉ DE L'ARTICLE: « IN VITRO EFFECTS OF SILICATE BASED MATERIALS BIODENTINE AND BIOROOT RCS ON DENTAL PULP STEM CELLS IN DIRECT AND INDIRECT MODELS»	165
OBJECTIFS	166
RESULTATS	167
ARTICLE.....	168
CHAPITRE4 : DISCUSSION.....	198
BIBLIOGRAPHIE	203

LISTE DES ILLUSTRATIONS

Figure 1 Schéma présentant les caractéristiques d'une cellule souche (Understanding Stem Cells An Overview of the Science and Issues, n.d.)	12
Figure 2 Schéma présentant les différents types de cellules souches (Lewis, n.d.).....	14
Figure 3 Schéma représentant les différents tests de pluripotence (Kieffer et al., 2010)	16
Figure 4 Schéma représentant la stratégie de reprogrammation des cellules somatiques <i>in vitro</i> (Kieffer et al., 2010)	17
Figure 5 Schéma représentant le devenir des cellules des crêtes neurales	19
Figure 6 Schéma représentant le célèbre dessin de Caplan en 1991 décrivant les capacités de différenciation des CSM (Hernigou, 2015)	22
Figure 7 Immunohistologie de CSM ayant une forme fibroblastique en aiguille	24
Figure 8 Les différents types de CSM de la cavité orale (Egusa, Sonoyama, Nishimura, Atsuta, & Akiyama, 2012)	33
Figure 9 Schéma représentant l'attache épithélio-conjonctive.....	35
Figure 10 Microphotographie d'un fibroblaste en culture	38
Figure 11 Schéma représentant un fibroblaste et ses différentes interactions	40
Figure 12 Photographie de deux anneaux de clonage et de leur utilisation	49
Figure 13 Microphotographie d'une neurosphère.....	50
Figure 14 Schéma des différentes conditions de mises en culture	72
Figure 15 Schéma de la régulation génétiques des gènes Oct4, Nanog et Sox2 (Göke et al., 2011).....	117

LISTE DES ABREVIATIONS

- A -

ABMSC : CSM de l'os alvéolaire (Alveolar Bone mesenchymal stem cells)
ADSC : Cellule souche dérivée du tissu adipeux (Adipous derived stem cells)

- B -

BMMSC : Cellule souche dérivée de la moelle osseuse (Bone Marrow stem cells)

- C -

CE : Cellule de carcinome embryonnaire
CFU-F : Colony forming unit fibroblastic
CS : Cellule souche
CSA : Cellule souche adulte
CSCN : Cellule souche dérivée de la crête neurale
CSE / CSEh : Cellule souche embryonnaire / Cellule souche embryonnaire humaine
CSG : Cellule souche dérivée de la gencive
CSM : Cellule souche/stromale mésenchymateuse multipotente
CN : Crête neurale

- D -

DFSC : CSM du follicule du bourgeon dentaire (Dental follicle stem cells)
DPSC : CSM de la pulpe dentaire humaine (Dental pulp stem cells)

- E -

EGF : Epidermal growth factor
EO : Epithélium odontogène

- F -

FG : Fibroblaste gingival
FGF ou bFGF : Fibroblast growth factor

- G -

GAG : Glycosaminoglycane
GSC : CSM de la gencive (Gingival derived stem cells)

- I -

iPS ou iPSC : Cellule souche pluripotente induite
ISCT : International Society for Cellular Therapy

- M -

MEC : Matrice extra-cellulaire

- O -

OMSC : CSM de la muqueuse orale (Oral mucosa stem cells)

- P -

PDLSC : CSM du ligament parodontal (Periodontal ligament stem cells)

- S -

SBF : Sérum bovin fœtal
SCAP : CSM de la papille apicale de la pulpe dentaire (Stem cells from apical papilla)
SHED : CSM des dents de lait exfoliées (Stem cells from human extracted deciduous teeths)
SKP : Cellules souches des follicules pileux de la face (Skin Progenitor Cells)

- T -

TGF- β : Transforming Growth Factor- β

INTRODUCTION GENERALE

La capacité de cicatrisation ou plus particulièrement de régénération de la gencive humaine est exceptionnelle et actuellement considérée comme quasi embryonnaire. La cellule fibroblastique, principale composante de la gencive, s'avère être la clé de voûte de ce potentiel tissulaire unique. Ainsi, le fibroblaste gingival autologue, d'obtention et de culture aisées, semble être un candidat de choix pour réparer, après transplantation, d'autres tissus. Cette cellule fait donc l'objet d'une attention particulière au sein de notre équipe depuis plusieurs années; et son utilisation en thérapie cellulaire continue d'animer tous les fantasmes.

La première thérapie cellulaire envisagée avec le fibroblaste gingival, fut le traitement de l'anévrisme de l'aorte abdominale. L'idée était de transposer les capacités de remodelage du fibroblaste gingival dans la paroi artérielle, comme alternative chirurgicale. Les résultats de ces travaux *in vitro* et *in vivo* chez l'animal, conduits dans le laboratoire de réparation artérielle de l'Hôpital Européen Georges Pompidou ; ont montré que le fibroblaste gingival entraîne une diminution du diamètre des anévrysmes et permet la reconstruction de l'architecture vasculaire (Durand et al., 2012; Gogly et al., 2007). La deuxième application a concerné le domaine cutané et plus particulièrement les plaies aiguës retrouvées chez les patients irradiés ; dont la reconstruction cutanée est souvent délicate. Sur un modèle animal, les résultats précliniques ont montré que le fibroblaste gingival apparaît au moins aussi efficace dans la reconstruction tissulaire que les cellules souches médullaires habituellement utilisées ; mais dont l'obtention et la culture sont généralement plus difficiles. Là encore, la cellule fibroblastique gingivale a montré tout son potentiel (Linard et al., 2015).

Une meilleure connaissance des caractéristiques du fibroblaste gingival et de sa sous-population « souche » comme leurs origines ou plus particulièrement le contrôle de leurs multipotences s'avère donc nécessaire. Cela nous donnera accès à une compréhension des mécanismes impliqués dans la régénération *ad integrum* de la gencive mais aussi à une meilleure utilisation de ces cellules comme outil thérapeutique ou encore comme modèle expérimental *in vitro*.

Dans la première partie de ce manuscrit, seront décrits les différents types de cellules souches et la place occupée par la cellule souche gingivale parmi celles-ci. Ensuite, seront abordés les travaux de recherche à proprement parlé constituant ce travail de thèse ; tels que l'isolation et l'origine des cellules souches gingivales, la caractérisation d'éventuelles sous-populations ainsi que la capacité de multipotence de ces cellules; pour finir avec un exemple d'utilisation comme modèle expérimental *in vitro*.

CHAPITRE 1 : PRESENTATION DU SUJET

1- LES CELLULES SOUCHES

GENERALITES

Le corps humain est composé d'environ 100 000 milliards de cellules appartenant à plus de 200 types cellulaires différents ayant une grande diversité (cellules du sang, de la peau, du système nerveux, des muscles, du cœur, du cerveau, du foie, etc...). Certaines cellules dites « spécialisées » ne peuvent plus se diviser, ni se reproduire à l'âge adulte alors que d'autres conservent la capacité de se reproduire tout au long de la vie. Parmi ces dernières, sont retrouvées des cellules dites « souches ».

Le terme de « stem cell », traduit de l'anglais par celui de « cellule souche » (CS), est apparu vers la fin du XIX^{ème} siècle dans quelques articles scientifiques portant sur l'analyse du développement embryonnaire et de la microscopie de la moelle osseuse. Les premiers articles ou conférences découlent de la théorie cellulaire de Schwann, Schleiden et Virchow. Ensuite, Haeckel après avoir décrit l'œuf fécondé, proposa que les cellules en dérivent. Cette idée a alors été popularisée en langue anglaise grâce à Wilson. Puis au début du siècle, Papanheim approfondira l'idée jusqu'à proposer des schémas de descendance de la cellule souche ; qui bien que simples ressemblent étonnamment à ceux d'aujourd'hui. En 1908, Maksimov va populariser cette notion dans une conférence à Berlin, la cellule souche est alors présentée à l'origine de toutes les lignées hématopoïétiques. Dans les années 20, un premier travail a alors suggéré l'existence de cellules « précurseurs » à l'origine de toutes les cellules sanguines présentes chez le poulet. Et dans les années 50, le concept de cellules souches adultes a alors été avancé pour rendre compte du renouvellement du sang ou encore de la peau. Mais c'est finalement Til et McCulloch qui démontreront pour la première fois la multipotence des cellules souches hématopoïétiques (Spiegel, 2013). Ces deux auteurs sont considérés par beaucoup comme les véritables découvreurs des cellules souches. En parallèle ces travaux seront supportés par les résultats de greffe de moelle dans les pathologies

hématopoïétiques. Ces travaux vont poser les jalons de l'étude des cellules souches adultes, et tous les autres tissus seront étudiés à l'aune des cellules souches hématopoïétiques.

Ce n'est qu'en 1980, que des cellules souches embryonnaires ont pu être extraites pour la première fois à partir d'embryons de souris. A l'heure actuelle, les cellules souches sont associées à l'idée de médecine régénératrice capable de traiter des pathologies graves et de régénérer des tissus. Mais qu'est-ce qu'une cellule souche ?

Le terme de cellule souche regroupe en réalité plusieurs types cellulaires et se définit comme une sorte de socle commun de propriétés cellulaires ; plutôt qu'une entité clairement identifiée.

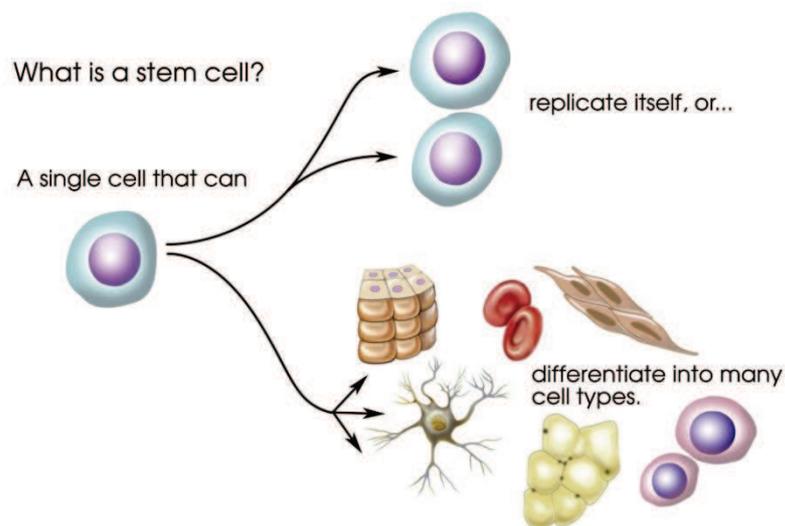


Figure 1 Schéma présentant les caractéristiques d'une cellule souche (Understanding Stem Cells An Overview of the Science and Issues)

Une cellule souche se définira donc comme une cellule capable de divisions asymétriques, donnant lieu à une première cellule fille permettant la conservation d'un potentiel d'auto renouvellement « souche » et une autre cellule fille qui sera le précurseur de différenciation dans une lignée cellulaire particulière. Plus couramment, une cellule souche se définira comme capable de se renouveler *in vitro* à partir d'une seule cellule (capacité de clonogénicité) d'une part, de pouvoir se différencier en plusieurs lignages cellulaires (potentiel de différenciation) d'autre part, et une capacité unique à protéger les télomères de leurs chromosomes (Bianco, Robey, & Simmons, 2008).

Toutes les cellules souches ne disposent pas du même potentiel de différenciation et s'organisent de manière hiérarchique (Jaenisch & Young, 2008):

- La cellule issue de la fusion entre l'œuf et la cellule spermatique (zygote) est totipotente, pouvant donner naissance à tous les types cellulaires de l'organisme ainsi que les annexes placentaires nécessaires au développement d'un embryon.

- Suite aux 5-6 premières divisions de l'œuf (gastrulation), on aboutit à la blastula composée de groupes de cellules appelées cellules de la masse interne, pouvant se différencier en tous les types cellulaires issus des 3 feuillets primordiaux embryonnaires. Ces cellules sont alors qualifiées de pluripotentes, ce qui signifie qu'elles ne pourront donner naissance, par différenciation, qu'à des cellules appartenant aux feuillets embryonnaires (ectoblaste, mésoblaste et endoblaste) ; soit environ 200 types cellulaires. On retrouve parmi ces cellules pluripotentes : les cellules souches embryonnaires (CSE) ou encore les cellules souches pluripotentes induites (iPSC).

- Les cellules résultantes se différencient à leur tour pour donner des cellules souches multipotentes ; présentes dans la plupart des organismes multicellulaires adultes. Ces cellules multipotentes, appelées cellules souches adultes ont un potentiel prolifératif plus limité que les CSE ; et ne seront capables de donner naissance qu'à des types cellulaires issus d'un même lignage cellulaire. Comme par exemple, les cellules souches myéloïdes de la moelle osseuse qui sont à l'origine des cellules sanguines (érythrocytes, monocytes, granulocytes...).

- Leur potentiel de différenciation va diminuer au fur et à mesure des divisions successives. Les cellules issues de toutes ces divisions sont alors dites unipotentes ; et seront capables d'auto régénération mais ne fourniront qu'un seul type cellulaire (foie, peau, cerveau etc...).

Pour finir, on retrouve souvent dans la littérature les termes de « progéniteur » ou encore de « cellule progénitrice » ; ceux-ci se réfèrent à des cellules multipotentes ou unipotentes présentant une capacité d'auto-renouvellement limitée.

LES DIFFERENTS TYPES DE CELLULES SOUCHES

Les cellules souches ont actuellement différentes fonctions dans les organismes mais contribuent principalement au renouvellement naturel des tissus ou encore à leur réparation en cas de lésion. Cependant, tous les organes n'en sont pas pourvus ; à l'image du cœur ou du pancréas. Les cellules souches peuvent donc être classées selon leur maturité en 2 types cellulaires: pluripotent (cellules souches embryonnaires, cellules souches pluripotentes induites) et multipotent (cellules souches adultes).

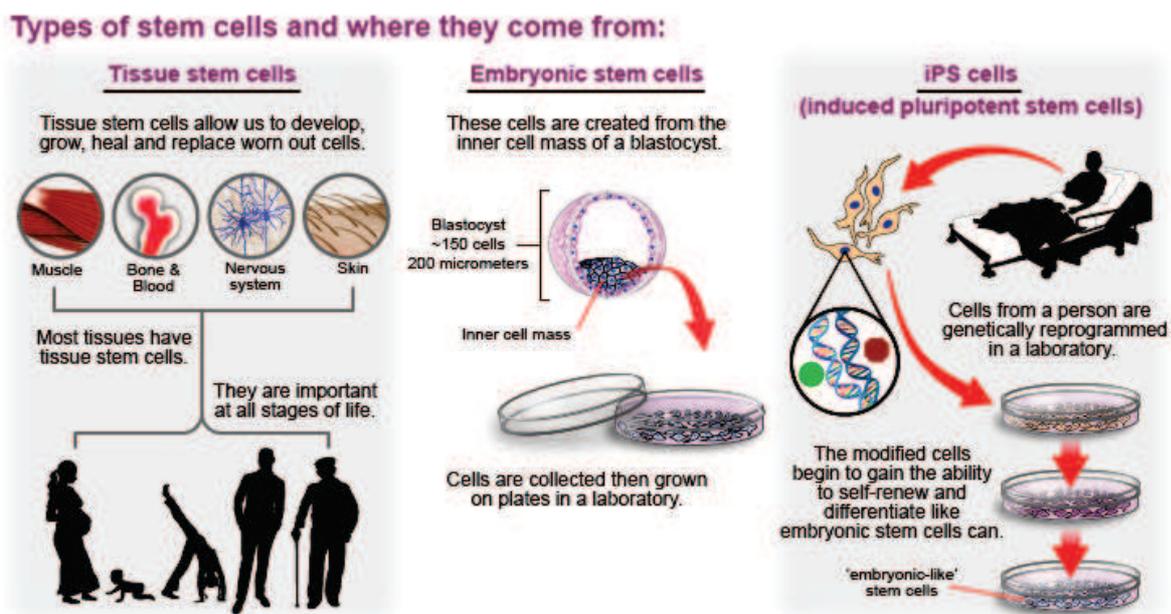


Figure 2 Schéma présentant les différents types de cellules souches (Lewis)

CELLULES SOUCHES EMBRYONNAIRES (CSE)

Les cellules souches embryonnaires (CSE) ont été isolées pour la première fois en 1981 chez la souris (Evans & Kaufman, 1981). Cette découverte faisant suite à l'isolation de tératocarcinomes dans les gonades de la souris, constitués d'un mélange de différents types cellulaires différenciés appartenant aux trois feuilletts embryonnaires (endoderme, mésoderme et ectoderme) ; ainsi que d'autres indifférenciés ressemblant à des cellules embryonnaires,

appelés « cellule de carcinome embryonnaire » (CE) (Martin & Evans, 1975). Et en 1998, la même équipe de chercheurs américains a montré la possibilité d'isoler, multiplier et maintenir à l'état indifférencié *in vitro* des cellules dérivées de la masse cellulaire interne du blastocyste humain (Thomson et al., 1998).

Les cellules souches embryonnaires humaines (CSEh) sont considérées comme pluripotentes ; car à l'inverse du zygote, elles ont déjà perdues leur compétence à former les annexes embryonnaires (Spiegel, 2013). Afin de maintenir ce caractère pluripotent ainsi que leur capacité à se répliquer indéfiniment ; les CSEh doivent être cultivées sous certaines conditions et au-dessus d'une couche de cellules nourricières (des fibroblastes embryonnaires irradiés). En effet, sans cette couche, les CSEh vont spontanément se différencier en divers types cellulaires. Les CSEh peuvent conserver un caryotype normal ou encore leur pluripotence après plus de 300 passages, et ont montré une aptitude à se différencier en de multiples types cellulaires, notamment musculaire, chondrogénique, cardiomyocytaire, neuronal, hépatocytaire ou encore pancréatique (Odorico, Kaufman, & Thomson, 2001).

Actuellement plusieurs tests permettent de confirmer la pluripotence de cellules souches *in vitro* et *in vivo* (Kieffer, Kuntz, & Viville, 2010) :

- *Formation de corps « embryoïdes »*

Des corps embryoïdes peuvent être formés *in vitro*, en suspension, puis être différenciés dans les lignages issus des trois feuillets embryonnaires.

- *Formation de tératomes*

Des tératomes peuvent être formés *in vivo*, par injection des cellules souches dans des souris immunodéficientes.

- *Formation de chimères*

Un animal chimère peut être formé par injection de cellules souches dans un blastocyste hôte, avant son implantation dans une souris femelle. De plus, lorsqu'elles colonisent la lignée germinale, ces cellules peuvent être à l'origine d'un organisme entier à la génération suivante.

- Complémentation d'embryons

L'injection de cellules souches dans un blastocyste tétraploïde hôte, bien qu'il ne bénéficie pas de l'environnement de la masse cellulaire interne; entraîne directement la génération d'un embryon totalement issu des cellules souches.

Les cellules souches embryonnaires présentent donc un intérêt en médecine régénératrice et notamment dans le traitement de nombreuses pathologies. Cependant,

l'utilisation des cellules embryonnaires est controversée pour des raisons légales et éthiques (Das, Bonaguidi, Muro, & Kessler, 2008). Premièrement, leur obtention nécessite la destruction d'embryons humains. A ce propos, l'emploi d'embryons en recherche n'est plus brevetable en Europe depuis octobre 2011. Deuxièmement, ces cellules sont techniquement difficiles à obtenir et à mettre en culture ; et peuvent produire des tumeurs malignes ou des tératomes au niveau de leur point d'injection *in vivo* (Takahashi & Yamanaka, 2006). Pour finir, ces cellules s'utilisant de manière allogénique, un risque de rejet immunitaire ne sera jamais à écarter.

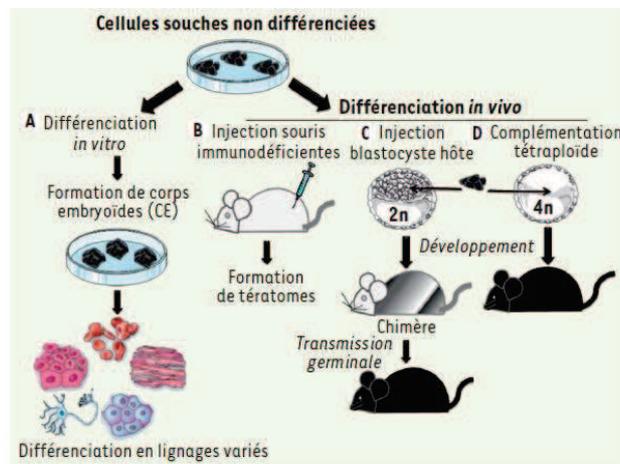


Figure 3 Schéma représentant les différents tests de pluripotence (Kieffer et al., 2010)

CELLULES SOUCHES PLURIPOTENTES INDUITES (iPS ou iPSC)

En 2006, l'équipe de Yamanaka a montré que des cellules souches aux propriétés similaires aux CSE pouvaient être générées à partir de fibroblastes dermiques de souris adulte suite à l'introduction simultanée d'un groupe de quatre gènes (Takahashi & Yamanaka, 2006). Un an plus tard, ces cellules appelées iPS ou iPSC (induced pluripotent stem cells) ont alors pu être générées par reprogrammation de cellules somatiques différenciées (des fibroblastes dermiques humains) en cellules pluripotentes ; par transduction de facteurs de transcription tels que Sox2, Octamer-binding protein (Oct3/4), Myelo cytomatosis oncogene (Myc) et Kruppel-like factor 4 (Klf4) (Takahashi et al., 2007). Le même jour, le groupe de James Thomson a également signalé la génération de ces mêmes cellules iPSC humaines en utilisant une combinaison de facteurs légèrement différente (Nanog, Lin28 à la place de c-Myc et Klf4) (Yu et al., 2007). Ainsi en 2012, la découverte de ces iPSC a permis au

scientifique Shinya Yamanaka d'être honoré du prix Nobel de médecine, qu'il partage avec l'inventeur du transfert nucléaire Gordon.

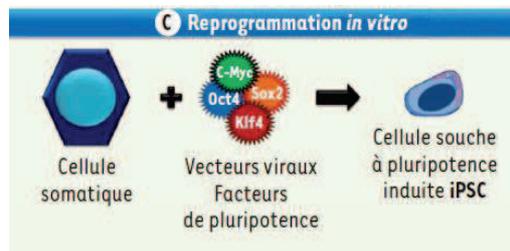


Figure 4 Schéma représentant la stratégie de reprogrammation des cellules somatiques *in vitro* (Kieffer et al., 2010)

Les iPSC présentent des caractéristiques similaires à celles des CSE au niveau de leur morphologie, de leur potentiel de différenciation et de leur auto-renouvellement. Les principaux avantages de ces cellules reposent sur la simplicité, la reproductibilité de leur manipulation génétique et leur capacité à se différencier dans divers types cellulaires appartenant aux trois feuillet embryonnaires. Les iPSC peuvent permettre de reproduire des modèles de maladies *in vitro* ; servir à tester des médicaments ou encore être utilisées à des fins thérapeutiques en permettant de recréer des tissus endommagés. Les iPSC peuvent former des tératomes lorsqu'elles sont injectées en sous cutané de souris immunodéficientes, des chimères lorsqu'elles sont injectées dans des embryons de souris ou encore compléter des embryons tétraploïdes. Il a toutefois été reporté que des instabilités et des anomalies génomiques peuvent apparaître lors d'une culture prolongée de ces cellules (Ji et al., 2012). Une grande prudence et de plus amples recherches semblent nécessaires avant d'envisager ces iPSC comme réel outil thérapeutique.

LES CELLULES SOUCHES ADULTES (CSA)

De nombreux tissus adultes contiennent des cellules souches ayant une capacité de renouvellement après un traumatisme, une maladie ou leur vieillissement. Ces cellules dites « cellules souches adultes » (CSA) sont présentes au sein même d'un tissu ou dans un tissu différent qui sert alors de réservoirs pour ces cellules souches. Les CSA permettent le maintien de l'intégrité du tissu adulte en permettant une homéostasie lors du remplacement cellulaire et/ou de la régénération tissulaire. Elles sont dites multipotentes et peuvent se différencier en différents types cellulaires au sein d'un même feuillet embryonnaire ; qu'il soit mésodermique (Pittenger et al., 1999), ectodermique (Kopen, Prockop, & Phinney, 1999) ou

endodermique. Ce concept est actuellement remis en question depuis qu'il semble possible d'induire expérimentalement une différenciation neuronale à partir de cellules adultes du feuillet mésodermique. Néanmoins, le principal avantage de ces cellules repose sur leur utilisation peu controversée sur le plan éthique et la possibilité de les utiliser comme une source autologue.

CELLULES SOUCHES DERIVEES DE LA CRETE NEURALE (CSCN)

La majeure partie des cellules souches adultes est dérivée du mésoderme ; cependant certains tissus mésenchymateux peuvent avoir une origine neurectodermique. C'est le cas notamment de certains tissus faciaux, dont les cellules proviennent de la migration des crêtes neurales céphaliques (Ibarretxe et al., 2012).

En effet, des cellules issues de la crête neurale (CN) ayant conservées leur caractère souche après leur migration dans différents tissus de l'organisme sont présentes à l'âge adulte. L'étude *in vivo* de ces cellules souches dérivées de la crête neurale (CSCN) est possible par le traçage de marqueurs spécifiques exprimés par ces cellules lors des stades précoces du développement. Ces cellules peuvent recréer différents lignages cellulaires *in vivo*. Ainsi, des études ont mis en évidence que ces CSCN pouvaient se différencier dans des dérivatifs appartenant aux feuillets ectodermique et mésodermique (Kaltschmidt, Kaltschmidt, & Widera, 2011).

Cependant, si la multipotence et l'auto-renouvellement de ces cellules ont été confirmés, des différences intrinsèques ont pu être établies entre les CSCN ; en fonction de la localisation et le stade de développement de l'organisme à partir desquels elles ont été isolées. Ainsi, la présence de cellules souches dérivées de la crête neurale a pu être identifiée au sein de tissus comme la peau, la pulpe dentaire (Stevens et al., 2008) ou le ligament parodontal (Coura, Garcez, Mendes De Aguiar, & Magini, 2008).

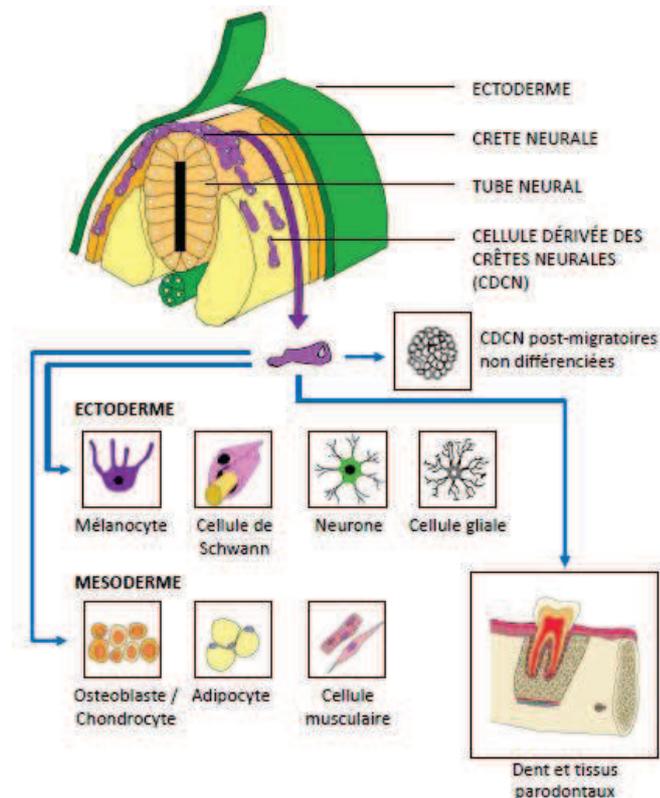


Figure 5 Schéma représentant le devenir des cellules des crêtes neurales

CELLULES SOUCHES DES PAPILLES DES FOLLICULES PILEUX DE LA FACE (SKP)

Par exemple, les cellules souches des papilles des follicules pileux de la face, appelées skin progenitor cells (SKP) isolées à la fois chez la souris et l'homme (J G Toma et al., 2001) ont la capacité de produire *in vitro* des types cellulaires qui ne dérivent normalement pas des cellules dermiques, comme par exemple des cellules neuronales. Ces cellules possèdent des marqueurs spécifiques des crêtes neurales, qui peuvent toutefois varier en fonction du type cellulaire, tel que la nestine, les facteurs de transcription Snail1, Sox10 ou encore Twist1. De plus, elles ont la capacité d'être cultivées en suspension dans un milieu sans sérum contenant du bFGF et de l'EGF ; sous forme de sphères appelées « neurosphères ».

L'utilisation des CSCN à des fins thérapeutiques en est encore à ses balbutiements ; cependant leur facile accessibilité en fait des candidats très intéressants.

REFLEXION

Si des CSCN ont pu être identifiées au sein de tissus comme la peau, la pulpe ou le ligament parodontal ; pourquoi n'en retrouverait-on pas dans une autre structure proche comme « la peau de la bouche » présente autour de la dent; c'est-à-dire la gencive ?

CELLULES SOUCHES NON MESENCHYMATEUSES ADULTES

La plupart des tissus chez l'adulte peuvent se régénérer, mais ce processus varie selon leur type: la peau et le sang se régénèrent vite, le foie aussi (Forbes, Vig, Poulosom, Thomas, & Alison, 2002) mais le tissu nerveux beaucoup plus lentement (Taupin & Gage, 2002). Cela semble attester de l'existence de cellules souches dans tous les tissus d'un organisme adulte quelques soient leurs origines embryonnaires.

Pour finir, va être décrite la dernière grande catégorie de cellules souches adultes ; les plus courantes: les cellules souches/stromales mésenchymateuses.

LES CELLULES SOUCHES STROMALES/MESENCHYMATEUSES (CSM)

HISTORIQUE

Comme vu précédemment, le concept de « cellule souche » est apparu à la fin du 19^{ème} siècle, comme postulat théorique permettant d'expliquer la capacité de certains tissus (peau ou sang) à s'auto-renouveler pendant toute la vie d'un organisme multicellulaire ; même si ceux-ci sont composés de cellules elles-mêmes à durée de vie limitée.

En 1867, des études de Louis Léopold Ollier ont décrites la moelle osseuse comme une possible source de cellules ayant un pouvoir ostéoprogéniteur. Deux ans plus tard, E. Goujon a pu décrire des expériences montrant la formation osseuse dans un modèle animal à partir de cellule issues de la moelle. Cependant, ces expériences ayant été menées avec des fragments de moelle osseuse, les cellules responsables d'un tel effet n'ont pu être identifiées précisément (Hernigou, 2015).

Le 1er février 1961, les chercheurs canadiens James Till et Ernest McCulloch ont révolutionné la recherche en publiant la preuve de l'existence des cellules souches. Pour l'anecdote, c'est par hasard qu'ont été réunis ces deux scientifiques. En effet, McCulloch médecin spécialisé en hématologie désirait comparer l'impact des radiations sur des cellules normales et cancéreuses, en procédant à des greffes de moelle osseuse sur des souris. Or, les règles en vigueur à l'Ontario Cancer Institute stipulaient que l'utilisation des radiations était strictement réservée aux médecins ; c'est ainsi que la rencontre a eu lieu avec le biophysicien

Till. Au cours de l'expérimentation menée, les deux chercheurs ont constaté que plus ils injectaient de cellules de moelle osseuse, plus les souris avaient des chances de survivre. Des masses cellulaires s'étaient formées dans la rate des souris ; proportionnellement à la quantité de cellules injectées. Ils ont ainsi postulé qu'ils étaient peut-être en présence de colonies de cellules nouvellement formées. C'est ainsi qu'ils ont révélé l'existence d'une cellule dite « mère » capable de se reproduire, mais aussi produire des descendants acquérant les caractéristiques propres des cellules spécialisées du sang.

Ensuite dans les années 1960-1970, une série d'expériences menées par l'équipe de Friedenstein a permis de démontrer que le potentiel ostéogénique d'une transplantation de moelle osseuse était principalement associé à une sous-population de cellules médullaires (Hernigou, 2015). Cette sous-population non hématopoïétique se distinguait de la plupart des autres, par une adhésion rapide aux récipients plastique de culture ainsi que par l'apparition d'une morphologie fibroblastique de leur descendance en culture. De plus, l'ensemencement de ces cellules à faible densité entraînait la formation de colonies à partir de cellules individuelles: Colony Forming Unit Fibroblastic (CFU-F). C'est notamment suite à ces observations que l'hypothèse d'une origine « stromale » de cellules médullaires a été posée.

En 1999, des travaux similaires publiés par Pittenger et coll. (Pittenger et al., 1999) sont venus confirmer les travaux précédents et surtout ce concept de « cellules souches médullaires non-hématopoïétiques ». C'est ainsi que Caplan introduisit le terme actuellement connu de « cellule souche mésenchymateuse » (CSM) comme alternative aux cellules souches précédemment décrites dites « stromales » ou « ostéogéniques » (Caplan, 1991). Mais on retrouve aussi ces mêmes cellules dans la littérature sous d'autres appellations, en fonction de la technique par laquelle elles ont été isolées et/ou mises en culture: « cellules mésenchymateuses de l'adulte », « progéniteurs mésenchymateux » ou encore « cellules stromales mésenchymateuses ». C'est pourquoi depuis 2005, la communauté scientifique, sous l'émanation d'une société scientifique internationale réunissant les spécialistes du sujet, a décidé que le terme de « cellules stromales/mésenchymateuses multipotentes » (CSM) serait la désignation recommandée pour nommer les cellules adhérentes au plastique isolées à partir de la moelle osseuse ou d'autres tissus (Dominici et al., 2006). Cependant, certains se demandent encore si ce terme est vraiment le plus approprié (Bianco et al., 2008).

PRESENTATION

Les cellules souches/stromales mésenchymateuses adultes, comme leur nom l'indique, dérivent du tissu de soutien embryonnaire appelé « mésenchyme » ou « stroma ». La majeure partie du mésenchyme est dérivée du mésoderme ; cependant certains tissus mésenchymateux, comme on l'a vu précédemment, peuvent avoir une origine neurectodermique, i.e. des crêtes neurales. Actuellement, les CSM les plus étudiées restent encore les cellules souches dérivées de la moelle osseuse (BMMSC) décrites par Friedenstein et al ; on les qualifie à cet effet de « gold standard » (Kuznetsov et al., 1997). Cependant, au cours de ces dernières années, des CSM ont été identifiées et isolées au sein d'autres conjonctifs adultes comme entre autres le tissu adipeux (Zuk et al., 2001), le cordon ombilical (Erices, Conget, & Minguell, 2000), le système nerveux central, la peau (Shih et al., 2005), le foie (Campagnoli et al., 2016).

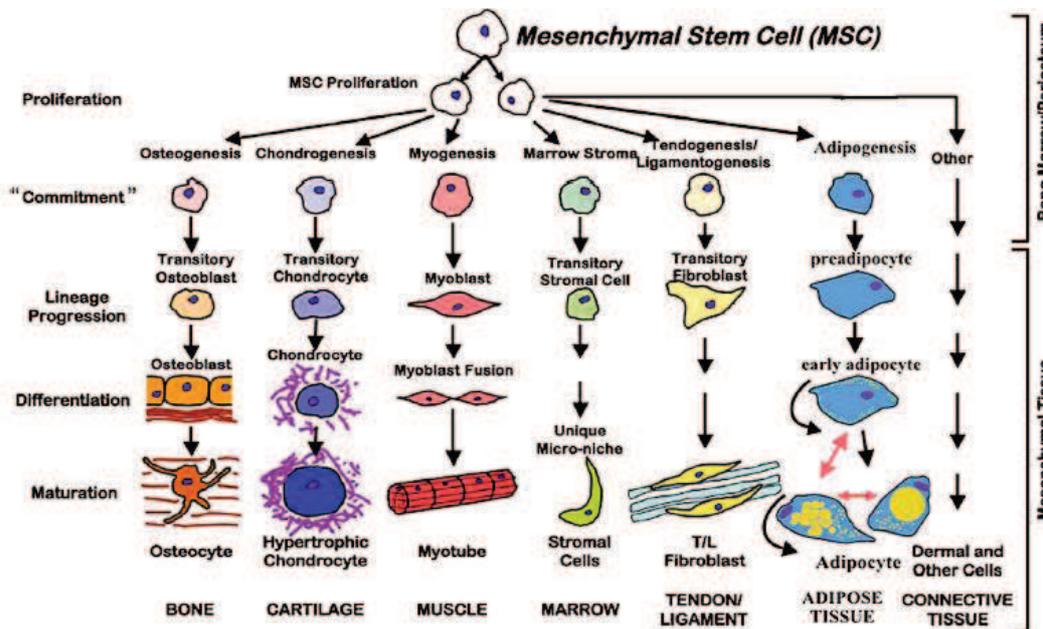


Figure 6 Schéma représentant le célèbre dessin de Caplan en 1991 décrivant les capacités de différenciation des CSM (Hernigou, 2015)

DEFINITION DE L'ISCT (INTERNATIONAL SOCIETY FOR CELLULAR THERAPY)

Récemment, due à l'absence d'une dénomination commune et claire entre les scientifiques, l'ISCT (International Society for Cellular Therapy) a statué sur une définition concernant les CSM.

Ainsi, peut être nommée « Multipotent Mesenchymal Stromal cells », toute population cellulaire obtenue à partir d'un tissu/organe ayant *in vitro* les caractéristiques minimums suivantes :

- Adhérence au plastique de culture
- Expression de certains marqueurs de surface cellulaire tels que CD73, CD90, CD105 et l'absence conjointe d'expression d'autres marqueurs CD45, CD34, CD14, CD11b, CD79 α ou CD19 et la molécule de surface HLA-DR
- Capacité à se différencier *in vitro* dans les types cellulaires du lignage mésenchymateux : ostéoblastes, adipocytes, et chondroblastes

Toutefois l'acronyme X-derived MSC sera préservé, avec X référant à l'organe ou au tissu d'obtention (exemple : Adipose tissue-derived MSC).

SOURCES TISSULAIRES

A l'heure actuelle, les cellules souches dérivées de la moelle osseuse sont certes les plus étudiées et les mieux identifiées ; cependant plusieurs limites sont observables à leur utilisation. Tout d'abord, l'obtention de ces cellules nécessite une technique invasive par ponction sous anesthésie générale. Un faible nombre de cellules est obtenu et nécessite entre autres d'être purifié avant leur utilisation, et secundo ces cellules possèdent une durée de vie assez limitée *in vitro*. Ces cellules souches sont capables de se différencier dans les lignées adipocytaires, chondrocytaires ou ostéoblastiques; mais leur potentiel de différenciation diminue avec l'âge (Mueller & Glowacki, 2001). Au fur et à mesure que ces cellules se divisent, elles perdent leur potentialité. Par conséquent, d'autres sources à partir de laquelle l'isolation de CSM est possible, font l'objet de recherches intensives.

Le tissu adipeux est une source alternative de cellules souches adultes qui peut être isolé par des techniques de liposuction (Zuk et al., 2001). Ce tissu contient des cellules souches adhérentes au plastique, facilement amplifiables, possédant un fort taux

de prolifération *in vitro*. Ces cellules souches dérivées du tissu adipeux (ADSC) sont multipotentes, et peuvent se différencier en adipocytes, chondrocytes, ostéoblastes, myocytes, ou neuronale. Ces ADSC apparaissent donc comme une source prometteuse en thérapie cellulaire, sans préoccupation d'ordre éthique ou de problèmes de rejet d'autogreffe (Gimble & Guilak, 2003).

Le cordon ombilical représente une autre source permettant d'obtenir des cellules souches mésenchymateuses de manière peu invasive ; sans préjudice pour la mère ou sa progéniture. Ces cellules sont présentes dans un tissu conjonctif dérivant du mésoblaste extra-embryonnaire, appelée « gelée de Wharton » du nom de son découvreur, Thomas Wharton. L'avantage, c'est que ce cordon est considéré juridiquement avec le placenta comme un déchet opératoire (Erices et al., 2000).

Récemment, des progéniteurs mésenchymateux ont également pu être isolés dans d'autres tissus conjonctifs comme ceux de la cavité orale : le tissu pulpaire (Gronthos, Mankani, Brahim, Robey, & Shi, 2000), le desmodonte, le tissu osseux, le follicule dentaire et bien sûr la gencive (Fournier et al., 2010; Wang et al., 2011).

CARACTERISTIQUES *IN VITRO*

MORPHOLOGIE

Les CSM présentent une morphologie hétérogène et ont généralement une forme fibroblastique en « aiguilles » (spindle shape). Cependant, en fonction de la source tissulaire, elles peuvent néanmoins avoir une forme polygonale ou encore cubique dans certains cas de confluence.

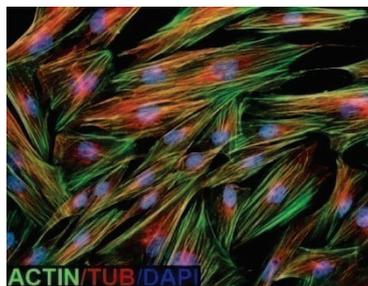


Figure 7 Immunohistologie de CSM ayant une forme fibroblastique en aiguille

PHENOTYPE DE SURFACE

Les CSM présentent un certain nombre d'antigènes de surface mais la plupart d'entre eux ne sont pas réellement spécifiques et peuvent être retrouvés à la surface de nombreuses cellules différenciées (Tableau N°1). Ainsi, l'expression des marqueurs est évolutive et peut dépendre de la source tissulaire, du procédé d'isolation ou encore des conditions de culture utilisées.

L'ISCT (International Society for Cellular Therapy) a néanmoins reconnu l'expression de certains marqueurs communs cités précédemment.

Tableau 1 - Marqueurs membranaires des CSM humaines

	Positives	Négatives
Molécules d'adhésion	CD106, CD166, ICAM-1, CD29	CD31, CD18, CD56
Molécules co-stimulantes		CD80, CD86, CD40
Marqueurs hématopoïétiques		CD445, CD34, CD14, CD11
Récepteurs	CD44, CD71	
Autres	CD105, CD73, CD90, Stro-1	

En plus des molécules précisées par l'ISCT, les CSM peuvent exprimer d'autres molécules telles que CD44, CD71, Stro-1, ou encore les molécules d'adhésion CD106 ou VCAM-1 (Vascular cell adhesion protein 1), CD166 ou ALCAM (Activated leukocyte cell adhesion molecule) ou encore ICAM-1. Cependant, elles n'exprimeront pas les molécules de co-stimulation CD80, CD86, CD40 ou encore les molécules d'adhésion CD31 ou PECAM-1 (Platelet endothelial cell adhesion molecule 1), CD18 ou LFA-1 (Lymphocyte function-associated antigen 1), et CD56 ou NCAM-1 (Neural cell adhesion molecule).

PLASTICITE / POTENTIEL DE DIFFERENCIATION

La multipotence des CSM se base sur la capacité de se différencier sous certaines conditions en plusieurs tissus mésenchymateux : l'os (Aslan et al., 2006), le cartilage (Johnstone, Hering, Caplan, Goldberg, & Yoo, 1998), le muscle (Rogers 1995), les

cardiomyocytes et le tissu endothélial (Oswald et al., 2004), le ligament et le tendon (Young, Butler, Weber, Gordon, & Fink, 1998).

Par la suite, ces cellules ont montré une possible « plasticité », c'est-à-dire la capacité à se transdifférencier *in vitro* d'autres types cellulaires ; voire même *in vitro* dans des tissus d'origine embryologique différente (par exemple endodermique). Cette « plasticité » reste néanmoins contestée (Phinney & Prockop, 2007).

Les CSM sont également dotées des propriétés immunosuppressives et anti-inflammatoires, d'où le vif intérêt qu'elles suscitent dans le cadre de leur utilisation potentielle en thérapie cellulaire (Le Blanc & Ringdén, 2007). Plus important encore, ces cellules peuvent être directement obtenues à partir de chaque patient (autologue), et ainsi éliminer les complications associées au rejet immunitaire.

HETEROGENEITE, CLONOGENICITE ET SOUS-POPULATIONS

La propriété de « clonogenité » est la capacité des CSM à maintenir un potentiel prolifératif, c'est-à-dire à s'auto-renouveler *in vitro* à partir d'une seule cellule en formant des colonies de cellules appelées « CFU-F » (Colony Forming Unit Fibroblastic). Ces CFU-F donneront à leur tour naissance à d'autres types de cellules plus spécialisées. Cette capacité des CSM à former des clones ou colonies est un modèle *in vitro* ayant permis de montrer qu'une population de CSM est en réalité un pool de plusieurs sous-populations cellulaires ou sous-ensembles de cellules progénitrices ; ayant des caractéristiques et des capacités de différenciation plus ou moins semblables. En effet, une population de CSM peut être génétiquement homogène *in vitro* sans être pure à 100% ; car une population pure nécessite d'être issue du renouvellement initial d'une seule cellule. Ainsi, une population de CSM est donc hétérogène et constituée de sous populations dites « clonales » ; c'est-à-dire de progéniteurs hautement régénératifs auxquels les auteurs se sont particulièrement intéressés récemment.

De nombreuses études démontrent que les clones, colonies ou CFU-F obtenus *in vitro* à partir d'une population initiale de CSM peuvent présenter des caractéristiques différentes comme une morphologie ou encore des capacités de prolifération et de différenciation différentes sans pour autant toujours démontrer une quelconque relation entre celles-ci (Russell, Lacey, Gilliam, Phinney, & O'Connor, 2011). De plus, il a été montré que les sous-

populations de CSM apparaissent elles-mêmes très hétérogènes *in vitro*, et peuvent être hiérarchisées selon leur capacité de multipotence *in vitro* (Tormin et al., 2009). L'équipe de Russel et al. a par exemple pu montrer que les clones obtenus à partir d'une population de CSM présentent des potentiels de multipotence dans les lignées adipo-, chondro- et ostéoblastique différents ; certains pourront ainsi être un-, bi-, ou tripotent. Plus encore, ces capacités semblent évoluer dans l'espace temps *in vitro*. Premièrement ; les sujets jeunes ont une fréquence de clones tripotents significativement plus élevée que des sujets âgés ; ce qui semble confirmer que la fréquence des CFU-F est inversement proportionnelle à l'âge (Quarto, Thomas, & Liang, 1995). Deuxièmement, les clones issus d'un même sujet entrent progressivement en sénescence, perdent ainsi leur potentiel initial multipotent, donnant naissance à des cellules ayant une capacité de multipotence moins élevée (un- ou bipotent) (Muraglia, Cancedda, & Quarto, 2000).

Ainsi, plusieurs paramètres autre que le temps semblent influencer la culture des CSM et de ses sous-populations tels que les conditions ou densité d'ensemencement, la méthode de clonage ou encore les produits et milieux de culture utilisés. Par exemple, il apparaît des variations considérables dans la proportion des sous-populations obtenues à partir de différents échantillons de moelle osseuse, même lorsque ceux-ci sont obtenus à partir du même donneur en même temps (Kuznetsov et al., 1997).

Pour finir, il n'existe actuellement pas de réels marqueurs ou épitopes de surface permettant la discrimination des sous-populations. Néanmoins, certains antigènes à l'image de Stro-1 présents sur les CFU-F des cellules de moelle osseuse humaine, ont été décrits comme pouvant être des marqueurs potentiels de sous-populations de CSM *in vitro*; bien que la présence de ceux-ci évoluent dans le temps (Gronthos, Graves, Ohta, & Simmons, 1994). Par exemple, il a été montré dans un modèle murin NOD/SCID irradié, que la co-greffe de cellules hématopoïétiques CD34+ avec une sous-population de CSM humaines Stro-1 positive présentait une meilleure capacité d'implantation tissulaire contrairement à la sous-population Stro-1 négative qui semble avoir un meilleur impact sur la prise de greffe des progéniteurs hématopoïétiques (Bensidhoum et al., 2004).

Ainsi, le contenu et la répartition de ces sous-populations semblent affecter grandement la capacité de thérapie tissulaire. Par exemple, une étude a montré que la sous-population de CSM utilisé influence les capacités de réparation d'un tissu comme le myocarde (Menasche, 2009).

REFLEXION

Le concept de cellule souche est un concept en lui-même déjà bien complexe, mais le concept de sous-population complique encore les choses. Ainsi une question simple se pose, dans la littérature pour un même tissu d'origine ; les auteurs parlent-ils tous bien des mêmes cellules et par conséquent du même sujet ? Et pourra-t-on bien reproduire les protocoles préconisés ?

CARACTERISTIQUES *IN VIVO*

NOTION DE NICHE

Dans le but de survivre, toute espèce doit avoir recours à un environnement où les ressources énergiques et nutritives sont favorables à sa reproduction ou au maintien de la stabilité de sa population. C'est pourquoi en 1978, Schofield a proposé la notion de « niche » pour décrire un environnement physiologique qui permet, entre autre, la pérennisation des cellules souches hématopoïétiques (Schofield, 1978). Ainsi, situées dans un endroit anatomique restreint de chaque tissu, appelé « niches », perdurent donc des cellules souches. La niche ou plutôt les niches sont des microenvironnements spécifiques qui permettent le maintien d'une homéostasie cellulaire ; c'est-à-dire qui régulent la multiplication et/ou la différenciation excessive des cellules et qui protègent les cellules souches des stimuli d'apoptose ou autres stimuli externes perturbateurs.

L'étude de niches de cellules souches présentes dans différents tissus a révélé plusieurs caractéristiques physiques et fonctionnelles communes (Jones & Wagers, 2008). Une niche, est donc une entité complexe et dynamique qui se compose :

- de cellules souches
- de cellules stromales appelées « cellules de support » qui interagissent directement avec les cellules souches par l'intermédiaire de récepteurs membranaires, de gap junctions ou encore de facteurs solubles
- d'une matrice extracellulaire qui sert de structure/milieu extérieur pour les différents échanges

- de vaisseaux sanguins qui permettent le recrutement de cellules inflammatoires ou autres cellules circulantes dans la niche ; mais aussi la circulation des cellules souches (nichage et mobilisation) et bien sûr l'apport de nutriments
- de fibres nerveuses qui permettent de communiquer de lointains messages physiologiques aux cellules souches dans leur microenvironnement

REFLEXION

Ce concept pose une question : Une niche unique de cellules orales existe-t-elle? Un endroit précis et localisé proche de la dent comme point de départ de plusieurs types de cellules souches orales existe-t-il? Un point de départ commun à toutes les cellules souches avant qu'elles migrent par la suite vers leur microenvironnement final...

2- LES CELLULES STROMALES MESENCHYMATEUSES ISSUES DES TISSUS DE LA CAVITE ORALE

RAPPELS SUR LA MORPHOGENESE CRANIO-FACIALE ET L'ODONTOGENESE

Le développement des structures orales s'inscrit dans le développement crânio-facial général. Les cellules pluripotentes issues des crêtes neurales céphaliques vont migrer le long du premier arc pharyngien et vont ainsi permettre en association avec des cellules mésodermiques le développement de nombreuses structures tissulaires du massif crânio-facial (Cobourne & Mitsiadis, 2006).

MORPHOGENESE BUCCO FACIALE

Au cours de l'embryogénèse, à la fin du stade de neurulation, un mouvement antéro-postérieur va ramener la partie céphalique de l'embryon sur la partie cardiaque. Ce mouvement permet la formation de plicatures qui donneront les arcs pharyngés ; créant ainsi un espace appelé « stomodeum ». Ce stomodeum est à l'origine de la future cavité buccale. Le 1er arc pharyngé va permettre le développement des procès maxillaire et mandibulaire sur lesquels se formeront les épithélia odontogènes (EO).

ODONTOGENESE

Le développement des dents résulte lui d'une série de plusieurs étapes continues et progressives : lame dentaire, bourgeon dentaire, capuchon, cloche, formation radiculaire, pour finir avec l'éruption. L'odontogénèse est un processus dynamique lié à des interactions épithélio-mésenchymateuses entre l'ectoderme du 1^{er} arc branchial et des cellules ectomésenchymateuses issues des crêtes neurales (CN) ; grâce à des molécules de signalisation et des facteurs de croissance. Ces cellules issues des CN contribuent par ailleurs à la formation du mésenchyme dentaire, de la pulpe, de la matrice de la dentine, du ciment ou encore du parodonte (Chai et al., 2000; Miletich & Sharpe, 2004). Ainsi, comme les cheveux, poils ou certaines glandes, l'émail dérive de l'ectoderme.

La formation d'une dent commence par une agrégation de cellules, appelée « germe dentaire » dérivant de l'ectoderme issu du 1er arc branchial. Ce tissu d'origine ectodermique

va se transformer en un tissu mésenchymateux appelé ectomésenchyme ou mésenchyme ectodermique. Le germe dentaire se divise en trois parties, une structure d'origine épithéliale l'organe de l'émail ; et deux structures ectomésenchymateuses : la papille primitive et le follicule fibreux. La papille primitive, sera à l'origine des odontoblastes, de la dentine et de la pulpe. Le follicule fibreux, sera à l'origine du système d'ancrage alvéolo-dentaire c'est à dire le cément, l'os alvéolaire et le desmodonte. L'organe de l'émail ou organe adamantin, se divisera en plusieurs parties: l'épithélium adamantin interne, l'épithélium adamantin externe, le stratum intermedium et le réticulum étoilé.

Les cellules de l'épithélium dentaire interne se différencient en améloblastes qui participeront à la minéralisation de la dent ; tandis que les cellules mésenchymateuses de la pulpe dentaire se différencient en odontoblastes. Ces différenciations sont régulées par des interactions épithélio-mésenchymateuses.

FORMATION DU PARODONTE

Le parodonte, qui est la structure de soutien de la dent, se compose du cément de la dent, du ligament parodontal ou desmodonte, de l'os alvéolaire ; et bien sûr de notre tissu d'intérêt la gencive.

Les cellules issues du follicule dentaire donnent naissance au ligament parodontal. Les fibroblastes du follicule dentaire sécrètent donc des fibres de collagène, qui vont permettre un amarrage du cément de la dent à la surface de l'os adjacent. Néanmoins, la formation de ce ligament est dépendante de l'occlusion inter dentaire, ce qui conduit à la formation de groupes de fibres avec des orientations différentes.

Les ostéoblastes vont permettre la formation de l'os entourant la racine et le cément de la dent : l'os alvéolaire. A l'image des autres os du corps humain, l'os alvéolaire se remodèle tout au long de la vie par l'intermédiaire d'une activation des ostéoblastes et des ostéoclastes ; sous l'influence de stimuli extérieurs.

La gencive est la partie des muqueuses buccales qui recouvre la dent et l'os alvéolaire. La gencive possède un revêtement épithélial variable selon les endroits et qu'on peut partager en trois types de tissus épithéliaux : buccal qui tapisse la plus grande partie de la gencive en dehors de l'étroite zone entourant les dents, sulculaire sur le versant externe du sillon dentaire et jonctionnel au contact du collet de la dent.

Finalement l'email s'avère être la seule structure qui ne contient pas de cellules progénitrices, car les améloblastes disparaissent après l'éruption dentaire et l'émail reste acellulaire.

Ainsi, les structures telles que le complexe pulpo-dentinaire, le ligament parodontal, l'os alvéolaire ou encore la gencive, se forment grâce à l'implication de CSM, dont le rôle est omniprésent.

LES DIFFERENTS TYPES DE CSM DE LA CAVITE ORALE

Au cours de ces dernières années, de nombreuses populations de cellules progénitrices ou CSM « orales » ont été isolées et caractérisées ; dans les tissus dentaires et/ou environnants. Ainsi à ce jour, huit populations sont couramment retrouvées dans la littérature. Les CSM de la pulpe dentaire humaine (Dental pulp stem cells - DPSC) ont été les premières décrites ([Gronthos et al., 2000](#)); puis progressivement d'autres populations de MSC ont pu être caractérisées :

- Les CSM des dents de lait exfoliées (Stem cells from human extracted deciduous teeth - SHED) ([Miura et al., 2003](#))
- Les CSM du ligament parodontal (Periodontal ligament stem cells - PDLSC) ([Seo et al., 2004](#))
- Les CSM du follicule du bourgeon dentaire (Dental follicle stem cells - DFSC) ([Morsczeck et al., 2005](#))
- Les CSM de la papille apicale de la pulpe dentaire (Stem cells from apical papilla - SCAP) ([Sonoyama et al., 2006](#))
- Les CSM de la muqueuse orale (Oral mucosa stem cells - OMSC)
- Les CSM de l'os alvéolaire (Alveolar Bone mesenchymal stem cells - ABMSC) ([Matsubara et al., 2005](#))
- Les CSM de la gencive (Gingival derived stem cells - GSC) ([Fournier et al., 2010](#); [Qunzhou Zhang et al., 2009](#))

Toutes ces cellules présentent les caractéristiques communes déterminées par l'ISCT. Plusieurs études récentes ont montré les avantages proposés par ces nouvelles sources cellulaires dans les thérapies tissulaires ou encore les immunothérapies régénératrices.

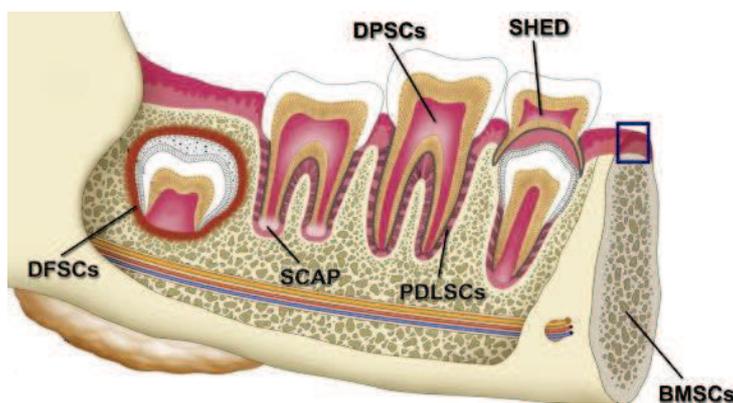


Figure 8 Les différents types de CSM de la cavité orale (Egusa, Sonoyama, Nishimura, Atsuta, & Akiyama, 2012)

CSM DE LA PULPE DENTAIRE HUMAINE (DPSC)

Les CSM de la pulpe dentaire ont été mises pour la première fois en évidence par l'équipe Gronthos dans les années 2000. Ces cellules sont généralement obtenues à partir du tissu pulpaire suite à l'avulsion d'une dent de sagesse ou encore d'une dent incluse. Ces cellules ont une capacité de prolifération rapide, possèdent de propriétés immunosuppressives, et sont capables de former et/ou réparer un complexe appelé « dentino-pulpaire ».

Deux populations de DPSC ont été caractérisées en fonction de leur origine : une originaire de la crête neurale et l'autre d'origine mésenchymateuse. Bien qu'il n'y ait pas de marqueurs spécifiques pour les identifier, les DPSC, expriment certains antigènes ou marqueurs de surface en plus de ceux reconnus par l'ISCT tels que STRO-1, CD146 et CD31 ; ou encore des marqueurs de cellules souches embryonnaires tels que Oct-4A, Nanog et le marqueur mésenchymateux Vimentine. Plus récemment, il a été observé qu'une partie de ces DPSC étaient SSEA-4 positives (Kawanabe et al., 2015).

Si les DPSC s'avèrent capables de former des nodules minéralisés semblables à de la dentine en réparation d'une précédente surface dentinaire lésée ; elles peuvent aussi se différencier *in vitro* en ostéoblastes, chondrocytes, adipocytes ou encore en cellules de type neural (D'aquino et al., 2007; Laino et al., 2005). La population de DPSC pour un même sujet est hétérogène et se confirme par sa clonogénicité. Plusieurs auteurs ont montré l'existence de plusieurs sous-populations de cellules progénitrices, qui diffèrent selon leur morphologie, leur capacité d'auto-renouvellement, de prolifération et de leur multipotence (Sumita, Tsuchiya, Asahina, Kagami, & Honda, 2009).

3- LES CSM DERIVEES DE LA GENCIVE OU CELLULES SOUCHES GINGIVALES (CSG)

Le sujet de cette thèse se concentre principalement autour d'un type cellulaire : la cellule souche mésenchymateuse dérivée de la gencive ou progéniteur souche gingivale ; plus couramment appelée « cellule souche gingival ».

Mais on ne peut aborder la notion de « cellule souche gingivale » sans présenter le « fibroblaste gingival ». En effet, l'attribution d'une localisation stromale aux cellules souches mésenchymateuses entraîne d'emblée une relation avec la cellule de soutien du tissu conjonctif : le fibroblaste. Où devrait-on dire plus exactement « les » fibroblastes ; car le terme de fibroblaste regroupe une hétérogénéité de cellules (Chang et al., 2002; Phipps, Borrello, & Blieden, 1997).

REFLEXION

Finalemnt, existe-t-il une réelle distinction entre un fibroblaste gingival et une cellule souche gingivale ?...

LA GENCIVE

Comme vu précédemment lors de la partie sur la formation du parodonte, la gencive est la partie des muqueuses buccales qui recouvre la dent et l'os alvéolaire. Mais pourquoi s'intéresser à la gencive ? Comme tout le monde a pu le remarquer une fois dans sa vie suite à une agression ou un traumatisme, cette muqueuse présente un fort pouvoir cicatrisant. D'autre part, elle présente l'avantage d'être facilement accessible notamment pour des chirurgiens-dentistes. Ainsi, ce travail se focalisera majoritairement sur les cellules qui la composent.

DEFINITION

La gencive est la partie des muqueuses orales de couleur rose pâle qui recouvre l'os des maxillaires au niveau alvéolaire et entoure les dents au niveau du collet. Elle est la partie visible du parodonte qui permet l'herméticité du système dent/parodonte. La gencive possède un revêtement épithélial variable selon sa situation anatomique, on distingue une gencive située au niveau vestibulaire et lingual appelée « marginale » et une gencive recouvrant le palais appelée naturellement « palatine ».

Globalement, la gencive se compose de deux parties : une partie épithéliale superficielle et une partie conjonctive située en dessous. Dans le sens corono-apical, la gencive se divise en deux parties : les gencives libre et attachée. La gencive libre se termine par le bord gingival libre aux contours festonnés et délimite, entre elle-même et la dent, un sillon appelé sulcus. La seconde recouvre directement l'os alvéolaire sous-jacent et assure une continuité avec les muqueuses buccale ou linguale. La papille gingivale est située dans l'espace de forme triangulaire entre chaque dent.

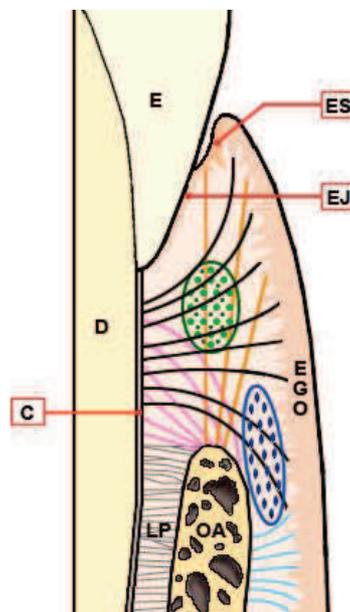


Figure 9 Schéma représentant l'attache épithélio-conjonctive

E : Email – D : Dentine – C : Cément – LP : Ligament parodontal – OA : Os alvéolaire – ES : Epithélium sulculaire – EJ : Epithélium de jonction – EGO : Epithélium

COMPOSITION HISTOLOGIQUE

D'un point de vue histologique, la gencive se compose superficiellement d'un épithélium malpighien plus ou moins kératinisé formant des interdigitations dans un tissu conjonctif sous-jacent. Cependant, plusieurs épithélia vont composer la gencive avec chacun leurs propres spécificités en fonction de leurs localisations : l'épithélium buccal composant majoritairement la gencive, l'épithélium dit de jonction situé dans le fond du sulcus au contact même des dents et l'épithélium sulculaire tapissant le sulcus qui va être en continuité avec l'épithélium de jonction.

Le tissu conjonctif sous-jacent aux épithélia, se compose majoritairement de fibroblastes « gingivaux », de collagène et de cellules inflammatoires.

PROPRIETES DE CICATRISATION ET POTENTIEL THERAPEUTIQUE

En tant que composante de la cavité buccale, la gencive se retrouve donc exposée aux mêmes traumatismes et agressions extérieurs subies par celle-ci: thermiques, mécaniques, chimiques ou infectieuses. Ceci a permis à la gencive d'acquérir certaines potentialités telles qu'une importante capacité de renouvellement cellulaire parmi les plus importants du corps humain ainsi que des capacités de régénération supérieures à la moyenne ([Winning & Townsend, 2000](#)). En effet, après une lésion ou une agression, la gencive est capable de se régénérer *ad integrum*, c'est-à-dire sans laisser de traces de fibrose ou cicatrice ([Schroeder & Listgarten, 1997](#)). A partir de modèles animaux comparant des plaies cutanées et gingivales, il a été montré cliniquement et histologiquement que la cicatrisation gingivale était plus rapide et présentait moins de cicatrices. C'est pourquoi, la cicatrisation gingivale est considérée par certains auteurs comme embryonnaire ("embryo-like") ([Schroeder & Listgarten, 1997](#)). La phase inflammatoire du début de la cicatrisation, est par ailleurs moins longue et importante que dans la peau, avec une baisse du recrutement de neutrophiles, de macrophages, et de lymphocytes T ([Szpaderska, Zuckerman, & Dipietro, 2003](#)). A l'inverse, le nombre de myofibroblastes est plus important dans la gencive que dans la peau 2 semaines après l'induction de la lésion. Les propriétés de cicatrisation de la gencive sont attribuables à plusieurs acteurs : les cellules épithéliales, qui, à partir des berges de la lésion, vont migrer vers son centre en reconstituant l'épithélium; le tissu vasculaire qui va fournir les éléments nutritifs nécessaires; la salive qui apporte un taux d'humidité favorable à la cicatrisation et qui

contient des facteurs de croissance (EGF, TGF- β , FGF, etc.) et des ions favorisant les réactions enzymatiques. Néanmoins d'anciennes expériences de greffes ont pu montrer que les cellules du tissu cicatrisant étaient plus importantes que les facteurs externes et notamment que la salive (Reilly, Behringer, & Trocki, 1980).

Cliniquement, la thérapie par greffe de tissu gingival au sien de la cavité buccale est utilisée usuellement avec succès depuis de nombreuses années. Ainsi, le potentiel thérapeutique de la gencive est actuellement bien reconnu *in vivo* (Lari Häkkinen, Larjava, & Fournier, 2014). De plus, le recours à des greffes autologues de muqueuse palatine a permis par exemple la reconstruction de la paupière chez l'homme (Weinberg et al., 2007) ou encore de greffe lors d'urétroplasties.

LE FIBROBLASTE GINGIVAL

Il est clair que le fibroblaste gingival est l'élément central responsable des diverses propriétés de la gencive, comme sa capacité de cicatrisation. Cependant, plusieurs questions peuvent être posées : La matrice extracellulaire (MEC) du tissu gingival ne se compose-t-elle (comme Saint Jacques de!) que d'un type de fibroblastes? Tous les individus possèdent-ils les mêmes fibroblastes ? Quel est l'origine embryologique du ou de ces type(s) de fibroblastes ?

DEFINITION

À première vue, le terme de « fibroblaste » semble simple et désigne avant tout un type de cellule appelé cellule de « soutien ». Les cellules fibroblastiques sont les cellules résidentes les plus présentes au sein des tissus conjonctifs de l'organisme ; on les retrouve donc dans la régulation de nombreux phénomènes cellulaires tels que l'embryogénèse, l'organogénèse ou encore le développement, l'homéostasie et l'entretien des tissus d'un organisme. Les fibroblastes s'avèrent aussi être des cellules clés intervenant au cours de plusieurs processus physiologiques ou pathologiques : comme la cicatrisation, l'inflammation, la fibrose ou encore le cancer (Lari Häkkinen, Larjava, & Koivisto, 2011; Haniffa, Collin, Buckley, & Dazzi, 2009).

La cellule fibroblastique a été observée en premier en 1847 par l'auteur de la théorie de la cellule, Théodore Schwann ; mais la première réelle description histologique de cette

cellule remonte aux années 70 par Virchow (Boor & Floege, 2012). Ce n'est seulement qu'au XX^{ème} siècle, que les premières mises en culture de biopsies ont permis d'obtenir des lignées fibroblastiques améliorant la compréhension des fonctions *in vitro* de cette cellule.

Plusieurs définitions existent pour les fibroblastes, mais un consensus est actuellement établi sur le fait que ce soit « Une cellule du tissu conjonctif d'origine mésenchymateuse qui sécrète des protéines comme le collagène et qui contribue à la formation de la matrice extracellulaire des tissus » (Boor & Floege, 2012). Généralement, les fibroblastes sont définis par des critères morphologiques et/ou fonctionnels qui ne leurs sont pas uniques. Primitivement arrondis, ils sont caractérisés en microscopie optique par un noyau ovale, une forme allongée, fusiforme ou encore étoilée. Leur longueur varie de 20 à 30 µm et leur largeur de 5 à 10 µm ; cependant ses dimensions sont difficiles à déterminer à cause de l'extrême ténuité de cette cellule.

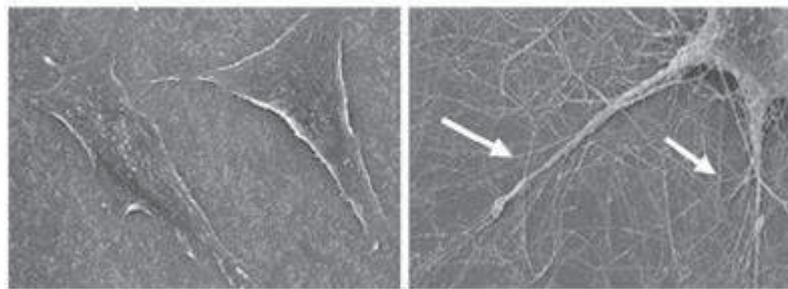


Figure 10 Microphotographie d'un fibroblaste en culture

Le terme de fibroblaste, bien que largement répandu, n'est pas tout à fait exact; car le suffixe « blaste » renvoie à une cellule dite « active ». Or, la plupart du temps, le fibroblaste est dans un état de repos; c'est pourquoi le terme correct devrait donc être « fibrocyte » comme cela est le cas pour d'autres cellules mésenchymateuses telles que les chondrocytes ou encore les ostéocytes. Cependant, le terme de « fibrocyte » est déjà utilisé autrement pour décrire un autre type cellulaire : des progéniteurs hématopoïétiques circulant exprimant les marqueurs CD45 +, CD33 + et Col1 + (Keeley, Mehrad, & Strieter, 2010).

Ainsi, les fibroblastes sont un groupe hétérogène de cellules ayant des caractéristiques générales communes non spécifiques mais aussi des propriétés et des fonctions distinctes ; on peut ainsi retrouver dans les tissus conjonctifs : les myofibroblastes, les fibrocytes, les péricytes ou encore des CSM. Les fibroblastes peuvent de plus subir des changements ou

variations liés à leur origine, leur vieillissement ou tout simplement au tissu au sein duquel ils sont présents.

Pourquoi donc s'intéresser à une telle cellule ? Par leur nature ou leur variation au sein du tissu auquel ils appartiennent, les fibroblastes peuvent avoir des fonctions bien différentes comme notamment intervenir dans des processus de réparation/cicatrisation cellulaire.

RÔLE

D'un point de vue dynamique, le fibroblaste a plusieurs rôles structuraux et fonctionnels dépendants de ses conditions environnementales *in vivo*.

REMODELAGE ET ORGANISATION DE LA MATRICE EXTRA-CELLULAIRE

La principale fonction des fibroblastes est de produire, organiser, dégrader ou encore remodeler les composants de la MEC avec laquelle ils interagissent par l'intermédiaire de récepteurs membranaires de type intégrine. La MEC fournit une intégrité structurelle aux tissus en créant un microenvironnement pour les cellules ; une sorte de niche accueillant plusieurs types cellulaires comme les cellules vasculaires, inflammatoires, épithéliales ou encore les cellules souches spécifiques d'un tissu. Cette niche est un lieu d'interactions cellulaires de type récepteur-ligand, de stockage et de libération de facteurs de croissance ainsi que de transmission de signaux mécano-sensoriels (Lari Häkkinen et al., 2011). Les fibroblastes communiquent donc avec d'autres types cellulaires soit par contact direct, soit en créant des réseaux de communication cellulaire ou encore en sécrétant et libérant des molécules (facteurs de croissance et/ou cytokines) dans la MEC. Ces différents types d'interactions permettent d'assurer l'homéostasie tissulaire, c'est-à-dire de veiller à un équilibre qualitatif et quantitatif des composants de la MEC nécessaires aux fonctions du tissu (Fournier, Larjava, & Häkkinen, 2013). Les fibroblastes ont une forte activité destructrice et synthétique permettant de dégrader la MEC, de la renouveler et de la réorganiser. A cet effet, ils sécrètent des enzymes telles que des métalloprotéases (collagénases et protéases), de l'élastine, de la fibrilline, ou encore des inhibiteurs de protéases matricielles. Un même fibroblaste peut ainsi être capable de sécréter plusieurs types de collagène et de l'élastine simultanément.

CICATRISATION ET REPARATION TISSULAIRE

La seconde fonction des fibroblastes est d'intervenir lors de phénomènes de cicatrisation et de réparation tissulaire. Le fibroblaste est alors capable de sortir de son état quiescent, de modifier son phénotype, de proliférer, et de synthétiser des cytokines impliquées dans la réponse inflammatoire et dans la cicatrisation aboutissant à la formation d'un tissu de granulation. Ce tissu néo formé va servir de matrice pour permettre une recolonisation, une migration ou encore une différenciation des fibroblastes favorisant la synthèse d'une nouvelle MEC. Par l'intermédiaire de protéoglycanes de surface et d'intégrines, le fibroblaste est capable de se lier aux éléments de la MEC de manière spécifique. De plus, certains facteurs comme le TGF- β (Transforming Growth Factor- β), vont permettre la différenciation du fibroblaste en myofibroblaste afin d'assurer la contraction de la plaie. Cette contraction va accélérer la cicatrisation en rapprochant les berges de la lésion (L Häkkinen, Uitto, & Larjava, 2000).

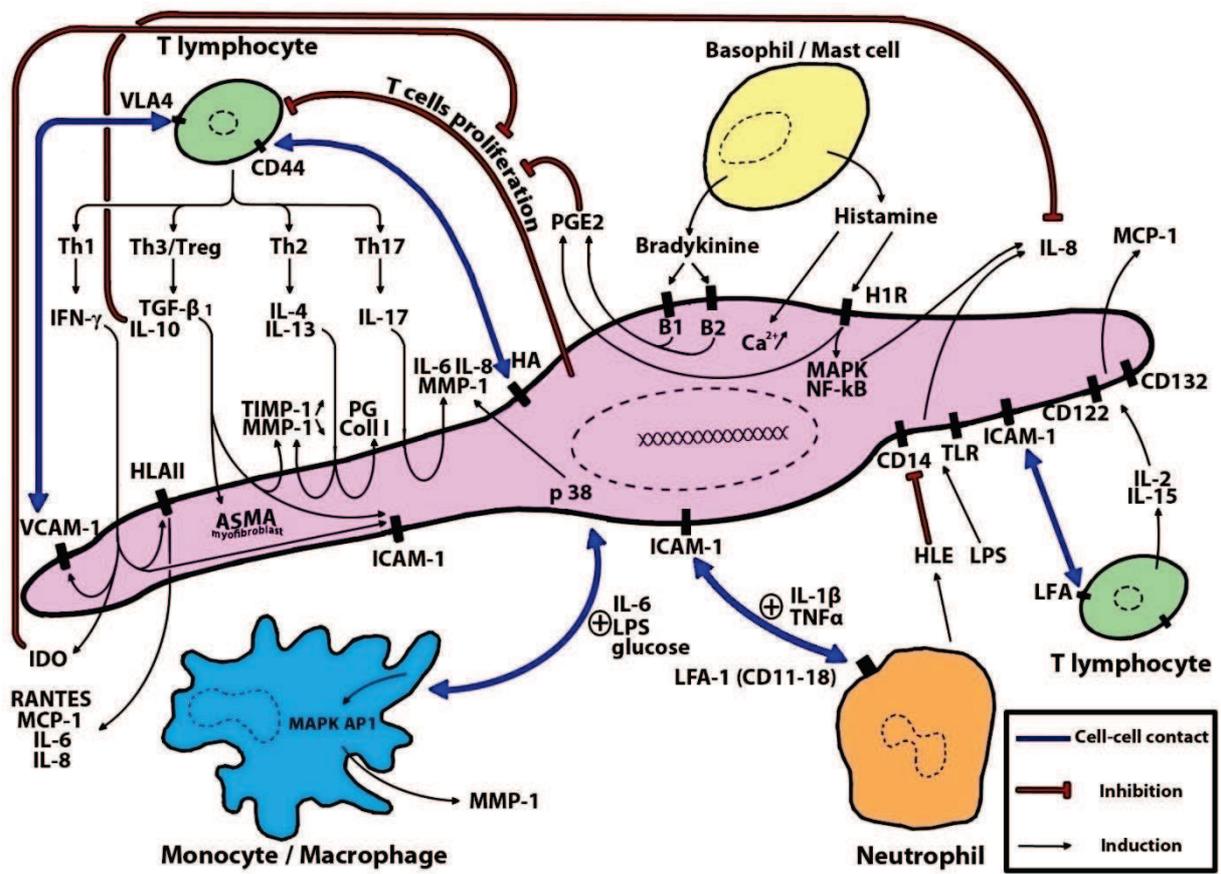


Figure 11 Schéma représentant un fibroblaste et ses différentes interactions

LE FIBROBLASTE GINGIVAL et SECRETIONS

Le fibroblaste gingival, FG de son petit nom, représente environ 60% des cellules du tissu conjonctif gingival, soit environ $200 \cdot 10^6$ fibroblastes par cm^3 . Comme tout fibroblaste, le FG va synthétiser les composants de la MEC gingivale : collagène, fibres, glycoprotéines, glycosaminoglycane (GAG) et d'autres protéines. Mais, à la différence d'autres MEC, certains composants pourront être quantitativement moins synthétisés.

COLLAGENES

Trois types de collagène vont être retrouvés dans le tissu conjonctif gingival : le type I (91%), le type III (8%) et le type V (moins de 1%) (Schroeder & Listgarten, 1997). Le collagène de type I est organisé soit en faisceaux larges et denses comme retrouvés dans l'appareil d'ancrage supra-radicaire ; soit en réseau à fibres courtes et fines associées au collagène de type III (Chavrier, Couble, Magloire, & Grimaud, 1984). Le collagène de type III s'organise en réseau réticulaire près de la membrane basale et de l'épithélium de jonction. Le collagène de type V, grâce à sa structure filamenteuse, va enrober les fibres de collagène de type I et III (Chavrier et al., 1984). D'autres types de collagènes, plus minoritaires, peuvent également être retrouvés ; comme les collagènes de type IV et VI.

RESEAU ELASTIQUE

L'élasticité du tissu gingival est permise grâce à la présence de trois types de fibres du réseau élastique au sein du conjonctif gingival : les fibres d'oxytalane localisées au tiers superficiel du tissu conjonctif, les fibres d'élaunine au tiers moyen et les fibres élastiques au niveau profond (Cho & Garant, 2000). Il est à noter que le FG synthétisera certains composants du réseau élastique en faible quantité comparé à d'autres MEC, cependant il les dégradera beaucoup moins au cours du temps.

GLYCOSAMINOGLYCANES (GAG)

Les glycosaminoglycane sont des chaînes composées de motifs disaccharides sulfatés ou non, pouvant être libres (acidehyaluronique) ou faire partie intégrante d'une glycoprotéine. Les GAG sont retrouvés dans l'ensemble du tissu conjonctif gingival. Le dermatane sulfate (60% des GAG total) représente le GAG le plus abondant, suivi du chondroïtine sulfate (30% des GAG total) et de plusieurs GAG plus minoritaire comme l'héparane sulfate (10% des GAG total) et l'hyaluronate (10% des GAGtotal).

GLYCOPROTEINES

- *Protéoglycanes*

Les protéoglycanes sont des glycoprotéines composées d'une protéine porteuse sur laquelle va pouvoir se lier un ou plusieurs GAG. Le biglycan, la décorine, le perlécan, le syndécan et le versican peuvent notamment assurer des fonctions essentielles au tissu conjonctif comme l'adhérence cellulaire, la croissance, la filtration ou encore l'hydratation tissulaire (Larjava, Häkkinen, & Rahemtulla, 1992). D'autres protéoglycanes vont participer à la régulation de la synthèse des collagènes, ou encore à la régulation des facteurs de croissance.

- *Glycoprotéines de structure*

D'autres glycoprotéines dites de structure vont assurer les liaisons entre les différentes molécules de la MEC et les cellules qui la composent. On retrouvera différents types de molécules comme la fibronectine, la laminine, mais également la fibronectine ou encore la ténascine.

Ainsi, les fibroblastes gingivaux sont rares et « piégés » dans le réseau de la MEC du tissu gingival; alors comment peut-on les isoler ?

ISOLATION

Les fibroblastes gingivaux comme ceux d'autres origines, sont obtenus directement à partir du tissu par une technique de culture dite « primaire ». La culture primaire consiste à extraire une ou plusieurs cellule(s) dans un organisme pluricellulaire et de la/les faire amplifier *in vitro*. Cette première culture pourra par la suite, une fois la confluence atteinte, donner lieu à des cultures dites « secondaires ».

HISTORIQUE

Mais avant de détailler et comprendre les mécanismes de culture primaires, un peu d'histoire ! En effet, jusqu'au XIX^{ème} siècle les scientifiques tentent de cultiver les cellules en laboratoire, mais sans succès car les échantillons meurent systématiquement. Ce n'est qu'à la fin du XIX^{ème}, que le Professeur Ross Harrison découvre une méthode de culture extra-corporelle en cultivant pour la première fois des neuroblastes de grenouille dans un milieu de lymphe.

Les premiers essais de véritables cultures dites « *in vitro* » remontent au début du XX^{ème} siècle. En 1902, le botaniste allemand Gottlieb Haberlandt montra que la principale idée de la culture *in vitro* était d'utiliser des milieux nutritifs capables de fournir aux explants les substances nécessaires à leur métabolisme. Ainsi, il a isolé des cellules ou des petits amas de tissus (cellules de poils staminaux de *Tradescantia*, poils glanduleux d'Ortie, épiderme de *Fuchsia*...) et les a transplantés dans des milieux de culture simples formés des principaux éléments minéraux nécessaires aux plantes, auxquels il ajoutait des substances énergétiques telles que du saccharose, du glucose, de l'asparagine. Il obtenait ainsi une survie de plusieurs mois, ainsi qu'un léger accroissement de la taille des cellules. Mais malgré tous ses efforts, celles-ci ne se multiplièrent jamais.

En 1912, le chirurgien français Alexis Carrel, réussit pour la première fois à mettre en culture les cellules d'un cœur de poulet, qui continuaient à battre et les cultiva plusieurs années durant. En fait il réintroduisait simplement de nouvelles cellules en les nourrissant avec un liquide embryonnaire. Ce n'est qu'en 1939 qu'apparut le concept de la totipotence cellulaire. Gautheret entra le premier dans l'histoire de la culture *in vitro* en cultivant pour la toute première fois des cellules isolées de carottes ; qu'il réussit à faire vivre pendant quelques mois sur un milieu stérile et nutritif.

En 1951, les cellules d'Henrietta Lacks prélevées lors d'une biopsie pour une opération du cancer du col de l'utérus et cultivées par le biologiste George Gay, se révélèrent « immortelles » en se reproduisant à l'infini alors qu'au contraire les cellules saines mourraient. Il était donc arrivé à cultiver pour la première fois des cellules humaines *in vitro* et constituer ainsi la première lignée cellulaire humaine, appelée lignée « HeLa » en référence à la propriétaire des cellules. Actuellement, cette lignée est toujours utilisée pour les études de cancérologie ou de biologie cellulaire effectuées sur des cellules humaines. Pour anecdotes : 1- Ces cellules auraient effectué un séjour dans l'espace afin de savoir si des cellules humaines pouvaient survivre en l'absence de gravité. 2- Le nombre actuel de cellules HeLa disponibles à travers le monde dépasse le nombre de cellules qu'Henrietta Lacks avait dans tout son corps.

En 1965, Leonard Hayflick a découvert que mis à part les cellules HeLa, chaque type cellulaire différencié de l'organisme humain ne pouvait se diviser qu'environ 52 fois avant de montrer des signes de sénescence. Il a appelé sobrement ce phénomène : « la limite d'Hayflick » (Watts, 2011).

La culture cellulaire primaire n'apparaît, a proprement parlé, qu'en 1952 avec l'introduction de la trypsinisation des tissus par Moscona. En effet, il a procédé à la digestion de tissu d'œuf de poulet avec de la trypsine afin d'obtenir des cellules isolées ou des amas de cellules capables de se diviser *in vitro*.

Ce n'est seulement qu'au XXème siècle, que les premiers fibroblastes gingivaux ont eux été isolés améliorant la compréhension des fonctions *in vitro* de cette cellule (Carrel & Ebeling, 1921).

LES DIFFERENTES TECHNIQUES DE CULTURE PRIMAIRE

Actuellement, la plupart des données scientifiques concernant le FG humain sont issues d'études réalisées *in vitro*. En raison de leur rareté dans les tissus, les fibroblastes doivent être isolés et amplifiés *in vitro* afin d'obtenir des quantités suffisantes de cellules ; c'est ce que l'on appelle « la culture primaire ». A la différence de cellules libres et circulantes, comme les cellules du sang, pouvant être obtenues par prélèvement et centrifugation ; les fibroblastes gingivaux constituent un tissu et sont par conséquent en cohésion les uns avec les autres. Le principe d'isolation des fibroblastes gingivaux consistera à détruire l'architecture du tissu, mécaniquement ou enzymatiquement, puis à séparer les cellules d'intérêt des cellules gênantes grâce à leur capacité d'adhérence à la boîte de culture, spécifique des fibroblastes ou au moins des cellules mésenchymateuses.

Actuellement pour tous types de tissus, de nombreuses techniques sont utilisées pour obtenir des cellules gingivales en fonction des auteurs ; mais deux grandes méthodes de culture dites « primaires » se distinguent permettant leur séparation et leur isolation à partir de biopsies de gencive. La première technique dite de « l'explant ou dissection » est la plus simple et la plus ancienne ; et a notamment permis l'isolation des premières cellules *in vitro*. Cette méthode est une approche non-chimique consistant à couper un prélèvement ou biopsie d'un tissu en plusieurs fragments d'environ 1 à 4 mm³ pour les placer ensuite dans une boîte de culture en plastique contenant un milieu nutritif approprié afin de les faire adhérer. Les cellules vont alors migrer à partir des différents fragments par contact direct avec la boîte, pour la coloniser puis se multiplier. La seconde méthode dite de « digestion enzymatique » consiste elle à utiliser des enzymes protéolytiques dans le but de digérer la trame protéique

qui entoure les cellules et ainsi dissocier les cellules les unes des autres. Selon les auteurs et les tissus étudiés, de nombreux types d'enzymes sont utilisés comme la trypsine, la dispase, la hyaluronidase ; mais concernant les prélèvements de gencive la plus utilisée s'avère être la collagénase.

Actuellement ces deux méthodes sont utilisées en routine dans la culture primaire avec leurs avantages et leurs inconvénients. La méthode par explant, moins invasive pour les cellules, est souvent utilisée quand la taille ou la quantité de tissu à mettre en culture est faible; mais le temps d'obtention pour une culture cellulaire confluyente est relativement long (au minimum 14 jours). La méthode enzymatique, plus fréquemment utilisée, s'avère quant à elle être une méthode alternative plus rapide avec un bon rendement mais certaines cellules à membrane fragile peuvent être lésées au cours de sa réalisation. La digestion enzymatique des tissus solides peut affecter négativement ses propriétés cellulaires, en raison de la fonte de l'environnement naturel des cellules (Liu, Wang, & Yan, 2009). Cependant, aucune de ces deux techniques ne permet d'être certain d'obtenir uniquement des fibroblastes gingivaux. En effet, soumis aux conditions de culture classique d'autres types cellulaires ou fibroblastiques sont capables de survivre et de proliférer ; tels que les myofibroblastes, les CSM présentes dans le tissu conjonctif, les péricytes ou encore les fibrocytes (Fournier, Larjava, & Häkkinen, 2013). Ce phénomène est appelé l'hétérogénéité fibroblastique. De plus, l'intérêt pour les différents types d'enzymes est actuellement mal documenté ; et de surcroît plusieurs protocoles d'utilisation d'une même enzyme peuvent exister ; comme pour la collagénase. Aussi, la qualité ou la cohérence d'une enzyme utilisée peut varier entre les lots et les fournisseurs et représentent donc une variable récurrente dans la littérature (Williams, McKenney, & Jarrell, 1995).

La culture primaire permet donc d'isoler un ensemble de cellules dites « hétérogènes » capables de se maintenir dans des conditions identiques mais qu'on ne peut réellement discriminer en raison de propriétés phénotypiques et fonctionnelles communes ou encore la présence de marqueurs membranaires identiques. *In vitro*, d'un point de vue morphologique, le FG va avoir à faible densité un phénotype élargi avec des prolongements autour de lui ; et devient fusiforme à forte densité, nouant de nombreux contacts avec les cellules voisines.

Aussi pour une éventuelle utilisation de ces cellules en thérapie cellulaire clinique, l'isolement fiable et répétitif d'un nombre suffisant de fibroblastes gingivaux dans un court

laps de temps est d'une grande importance ; la mise au point d'une technique de culture permettant une sélection stricte des fibroblastes apparait donc nécessaire.

REFLEXION

Face à ces constatations, et de même que ma précédente réflexion sur les cellules souches ; plusieurs questions ayant orientées ce travail peuvent naturellement se poser. Sélectionne-t-on réellement les mêmes cellules appelées « fibroblastes gingivaux » avec les différents protocoles ou enzymes utilisés? Un biais n'est-il pas créé dans la littérature à cause des différents protocoles ou enzymes utilisés ?

ORIGINE

Comme expliqué dans les rappels sur la morphogénèse cranio-faciale ; la plupart des tissus buccaux et cranio-faciaux sont issus de la migration au cours du développement de cellules provenant de la crête neurale (CN) (Chai et al., 2000). Les études réalisées sur le petit animal montrent qu'à l'image des autres cellules constitutives des structures craniofaciales, les FG semblent dériver embryologiquement majoritairement des CN. Ainsi, les FG seraient en réalité les cellules dites « filles » issues de cellules post-migratoires des CN ; à l'image des fibroblastes de la muqueuse orale exprimant les marqueurs des CN : nestine, β III-tubuline et GFAP (Marynka-Kalmani et al., 2010). Néanmoins, il semblerait qu'une petite fraction soit d'origine mésodermique comme la plupart d'autres fibroblastes (Fournier et al., 2013; Xu et al., 2013). Plusieurs facteurs semblent influencer la proportion de ces deux origines comme, entre autres, l'âge de l'individu. Une étude réalisée sur les cellules adipeuses de la face, a par exemple montré, que ces cellules dérivant à l'origine uniquement des CN ont été progressivement colonisées lors du vieillissement par des adipocytes d'origine mésodermique (Lemos et al., 2012).

Ainsi, une certaine « hétérogénéité » embryologique semble se distinguer au sein des fibroblastes gingivaux d'un même individu ; dont la proportion semble à ce jour encore inconnu.

HETEROGENEITE

Schor et son équipe ont montré en 1987 que le tissu conjonctif était composé de plusieurs populations hétérogènes distinctes de fibroblastes ; montrant des différences dans la prolifération et la morphologie cellulaire ou encore la synthèse de certaines molécules et que ces différents paramètres évolueraient au cours de processus physiologiques et pathologiques (Schor & Schor, 1987). Ainsi, toutes ces populations contribueraient aux propriétés de guérison « scarfree » de la gencive (Irwin et al., 1994) .

Même si l'on ne doit pas oublier la variabilité inter-individus; seuls les facteurs contribuant à l'hétérogénéité des fibroblastes au sein d'un même individu seront abordés dans ce paragraphe. Le tissu conjonctif de la gencive est donc constitué d'un ensemble de fibroblastes phénotypiquement et fonctionnellement différents. Ainsi, en fonction de leur localisation au sein même de la gencive ; le FG va synthétiser des composants en quantité différente. Par exemple, la composition de la MEC est différente entre les papilles interdentaires et la gencive attachée; une quantité plus importante de molécules pro-cicatrisantes (Fibronectine, Ténascine-C, TGF- β) sera retrouvée au niveau des papilles interdentaires. De même, l'existence d'une hétérogénéité morphologique des fibroblastes au sein du tissu de granulation a été démontrée. Que ce dernier soit formé au cours d'un processus de cicatrisation ou lors de lésions induites par une parodontite, trois types cellulaires morphologiquement différenciables sont obtenus : une forme fusiforme, une forme large et étoilée et une forme épithélioïde. Les cellules étoilées présentant par exemple une capacité proliférative moindre que les deux autres types cellulaires (Hakkinen & Larjava, 1992).

Au regard des capacités thérapeutique et de cicatrisation qu'offre le FG et des nombreuses études mettant en évidence la présence d'une hétérogénéité intra-tissulaire, plusieurs équipes dont la nôtre ont émis l'hypothèse selon laquelle le tissu conjonctif gingival pouvait contenir des CSM dans la gencive.

REFLEXION

Dans ce contexte d'hétérogénéité intra-tissulaire ; cette sous-population de CSM dérivée de la gencive existe-t-elle réellement ? N'y en a-t-il alors qu'une seule ? Quels critères permettent de la ou les différencier réellement des autres fibroblastes de ce même tissu ?

LA CELLULE SOUCHE GINGIVALE

PRESENTATION

La cellule souche mésenchymateuse dérivée de la gencive, appelée couramment « cellule souche gingivale » doit en réalité être qualifiée de « progéniteur souche gingival » ; le terme de « progéniteur » se référant à un pouvoir multipotent associé à une capacité d'auto-renouvellement limitée.

ISOLATION

Actuellement, aucune méthode standardisée ne permet d'obtenir des cellules souches gingivales. Néanmoins, plusieurs stratégies d'isolation de ces cellules liées aux critères définis par l'ISCT existent. Les cellules seront premièrement sélectionnées sur leur capacité d'auto-renouvellement ; c'est-à-dire leur capacité à former des colonies de cellules à partir d'une seule. Dans un second temps, les cellules précédemment isolées devront présenter la combinaison de marqueurs ou antigènes de surface définis: CD73+, CD90+, CD105+ et l'absence de CD45-. Pour finir leur pouvoir multipotent dans les types cellulaires de la lignée mésenchymateuse devra être confirmée par leur capacité à se différencier in vitro dans les types cellulaires ostéoblastique, en adipoblastique, et chondroblastique.

Ainsi, une fois la culture primaire de fibroblaste obtenue; trois grandes méthodes permettent l'isolation de cellules ayant la plus grande capacité d'auto-renouvellement.

METHODE N°1 : CULTURE PRIMAIRE OBTENUE A PARTIR D'EXPLANT

Suite à une culture primaire obtenue par explant, deux méthodes de culture secondaire seront possibles avec un même objectif commun : sélectionner les colonies de cellules filles formées à partir d'une cellule. La première, la plus simple, consiste tout simplement à ensemercer manuellement ou à l'aide d'un tri cellulaire 1 unique cellule issue de la culture primaire dans un puits de culture adapté et attendre la formation ou non d'une colonie. La seconde, plus technique dépendante, consiste à réaliser une culture secondaire selon un principe de dilution limite. Les cellules seront ensemençées à une très faible densité (moins de

50 cellules/cm²) permettant ainsi leur espacement unitaire dans la boîte de culture ; afin de sélectionner et amplifier dans un second temps les éventuelles colonies formées ; à l'aide d'un anneau de clonage (Mathupala & Sloan, 2009).

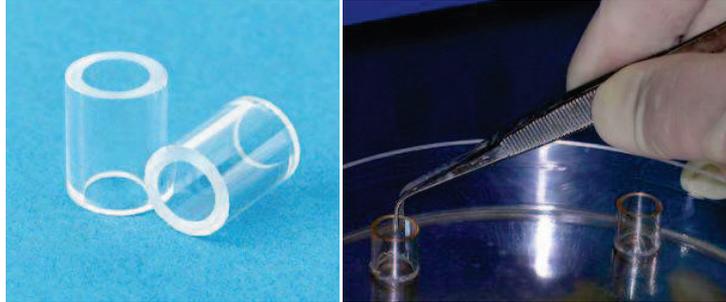


Figure 12 Photographie de deux anneaux de clonage et de leur utilisation

METHODE N°2 : CULTURE PRIMAIRE OBTENUE A PARTIR DE DIGESTION ENZYMATIQUE

La méthode par digestion enzymatique permet quant à elle d'obtenir dès sa mise en culture une dilution limite de cellules. Ainsi, dès la culture primaire, les colonies de cellules formées pourront être sélectionnées et amplifiées ; toujours à l'aide d'un anneau de clonage.

METHODE N°3 : LE TRI CELLULAIRE

Cette méthode consiste à trier ou séparer les cellules obtenues par culture primaire en fonction de l'expression de marqueurs ou antigènes de surface ; par fluorescence (FACS) ou encore autres techniques de séparation. Cependant, comme vu précédemment, les marqueurs choisis peuvent également être présents sur d'autres cellules du tissu conjonctif telles que les fibroblastes, les péricytes, les myofibroblastes et les fibrocytes.

REFLEXION

Là encore l'isolation ou la sélection de colonies semble être un phénomène variable et technicien dépendant. Comment être sûr d'isoler une seule cellule? Et comment être sûr de bien sélectionner les cellules d'une seule colonie et non pas au passage des cellules ayant migrées d'une colonie voisine ?

ORIGINE

A l'image du FG, la cellule souche gingivale semble majoritairement dériver des crêtes neurales; et serait par conséquent une cellule « fille » issue d'une cellule post-migratoire des CN. Récemment, une autre approche a été développée pour confirmer cette théorie sur le modèle des précurseurs dérivés de la peau humaine (SKP). En effet, ces cellules ont pu être cultivées en suspension dans un milieu « sans sérum », en condition non adhérente au plastique, mais contenant les facteurs de croissance EGF et FGF-2 principalement utilisés dans la culture des cellules souches neurales (J G Toma et al., 2001; Jean G Toma, McKenzie, Bagli, & Miller, 2005). Cette technique conduit à la formation de petits amas sphériques de cellules en suspension appelés « neurosphères ». Ces neurosphères, précurseurs théoriques de cellules de la lignée neurale, expriment donc conjointement des marqueurs de type fibroblastique mais aussi d'origine de la crête neurale.

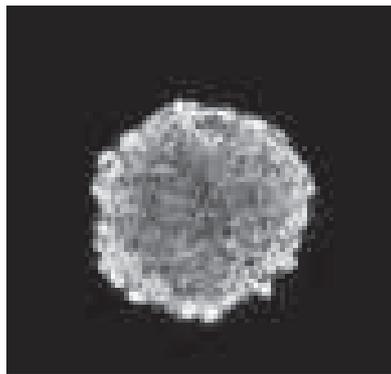


Figure 13 Microphotographie d'une neurosphère

CLONOGENICITE ET SOUS-POPULATIONS

Si concernant d'autres types de MSC, des expériences de différenciation menées à l'échelle clonale ont mis en évidence l'existence de clones ou sous-populations uni-, bi- ou pluripotent dans le lignage mésenchymateux adipo-, ostéo-, chondrocytaire *in vitro* ; aucune expérience n'a à ce jour été réalisée sur des cellules souches gingivales.

Par ailleurs, l'origine des capacités (prolifération, multipotence,...) d'une population de cellules souches gingivales ne semble pas claire. Mais, il ne serait pas surprenant qu'à l'image de la pulpe dentaire il existe une hétérogénéité de sous-populations de cellules souches gingivales ayant des capacités d'auto-renouvellement, de prolifération ou de différenciation différentes.

REFLEXION

Y a-t-il une ou plusieurs sous-populations de cellules impliquées dans les propriétés de population originale ? Pouvons-nous trouver un ou plusieurs marqueurs permettant d'isoler ces sous-populations?

PLASTICITE ET MULTIPOTENCE

Les cellules souches gingivales sont naturellement capables de se différencier en cellules myofibroblastiques. De plus, de manière semblable à d'autres CSM, les cellules souches gingivales ont la capacité de se différencier *in vitro*, dans les différents types cellulaires de la lignée mésenchymateuse de type ostéoblastique, adipoblastique, et chondroblastique (Fournier et al., 2010; QZ. Zhang, Nguyen, Yu, & Le, 2012). Il est à noter à ce sujet que les cultures secondaires issues d'une culture primaire de FG sont également capables d'être induites en ces mêmes lignées. Ce phénomène n'apparaît pas surprenant et semble bien confirmer la présence d'une sous-population souche au sein de la population de FG ; néanmoins cette capacité s'estompe avec le temps.

La plasticité est la capacité que possède une cellule souche à acquérir différents programmes de différenciation dans des lignées différentes. A cet effet, il a été montré que les cellules souches gingivales sont capables de se différencier dans des types cellulaires endodermique et neuronaux (Marynka-Kalmani et al., 2010; Qunzhou Zhang et al., 2016). Aussi, les cellules dérivées de la crête neurale ont montré un meilleur potentiel de différenciation chondrogénique et un taux plus élevé d'expression de marqueurs β -tubuline, nestine et le neurofilament M dans des conditions de culture neurogène *in vitro*.

GENE DE PLURIPOTENCE

La pluripotence correspond à la capacité d'une cellule à se différencier en plusieurs types cellulaires qui composent l'organisme ; ceci est notamment rendu possible grâce à l'expression de gènes de pluripotence tels qu'Oct4A, Sox2, Nanog, Klf4, c-Myc, Rex1 et Lin28. Fait intéressant, la transfection de ces gènes dans des cellules somatiques adultes permet de ramener le potentiel de différenciation d'une cellule à son état embryonnaire, générant ainsi des cellules souches pluripotentes induites (iPS) (Takahashi & Yamanaka,

2006). Par conséquent, l'expression du gène de caractère souche peut être importante dans le maintien d'un phénotype de cellule souche ou encore dans son potentiel de régénération tissulaire. Or, dans une étude récente, il a été observé qu'une majorité des cellules souches gingivales exprimait les gènes Oct4, Sox2 et Nanog liés à la pluripotence.

REFLEXION

Pourquoi ne pourrait-on pas relier ces gènes de pluripotence avec certains fibroblastes gingivaux ou encore sous-populations gingivales?

CHAPITRE 2 : OBJECTIFS & STRATEGIES EXPERIMENTALES

Ce travail fait suite à 1 thèse d'université soutenue en 2013, sur l'isolation et la caractérisation de cette cellule souche gingivale et sa capacité de différenciation. Les objectifs ont été de tenter de répondre à toutes les petites réflexions exprimées durant la première partie présentée. Ainsi, une approche *in vitro*, utilisant des cultures primaires issues de biopsies de gencive, a permis d'étudier l'influence de la méthode d'isolation des fibroblastes gingivaux, l'origine des fibroblastes gingivaux et cellules souches gingivales, ainsi que leur multipotence sous certaines conditions. Pour finir, deux exemples d'utilisation de ces cellules ainsi comme modèle d'étude de la biocompatibilité de biomatériaux *in vitro* ont été exposés.

OBJECTIF N°1 :

Étude de l'influence de la méthode d'isolation des fibroblastes gingivaux (GF) sur l'obtention des cellules souches gingivales humaines (CSGH)

OBJECTIF N°2 :

Étude de l'origine embryologique des fibroblastes gingivaux (GF) et cellules souches gingivales humaines (CSGH)

OBJECTIF N°3 :

Étude et caractérisation des sous-populations de cellules souches gingivales humaines (CSGH)

OBJECTIF N°4 :

Exemples de plasticité et multipotence induites pour les cellules souches gingivales humaines (CSGH)

OBJECTIF N°5 :

Exemples d'utilisation des cellules souches orales en biomatériaux

CHAPITRE 3 : RESULTATS

1^{ère} PARTIE

ETUDE DE L'INFLUENCE DE LA METHODE D'ISOLATION DES FIBROBLASTES GINGIVAUX (GF) SUR L'OBTENTION DES CELLULES SOUCHES GINGIVALES HUMAINES (CSGH)

Actuellement, deux méthodes de culture dites « primaires » se distinguent pour l'isolation des fibroblastes à partir d'un tissu comme la gencive : la méthode de « l'explant ou dissection » et la méthode par « digestion enzymatique ». La méthode empirique de l'explant consiste à couper en petits morceaux une biopsie d'un tissu et de l'étaler sur une boîte de culture en matière plastique; dans le but de faire adhérer et migrer les cellules sur la surface du plastique. Cependant, pour réduire les facteurs tels que le coût et le temps d'isolation, les auteurs se sont intéressés à développer des techniques alternatives à base d'enzymes protéolytiques. Si la méthode par explant apparaît peu invasive pour les cellules ; la méthode enzymatique s'avère quant à elle la plus utilisée pour une isolation plus rapide des cellules.

Selon les articles, plusieurs types d'enzymes telles que la trypsine, la dispase, la hyaluronidase peuvent être utilisées seules ou en combinaison; mais concernant les prélèvements de gencive la plus utilisée reste la collagénase. Plusieurs types de collagénase existent sur le marché et les protocoles d'utilisation varient selon les auteurs. L'utilisation de la collagénase de type I est retrouvée dans l'isolation des cellules pulpaire (Gronthos et al., 2000), les collagénases de type II et IV dans l'isolation de cellules gingivales (Fournier et al., 2013; Wang et al., 2011). Les différences ou encore l'intérêt de ces différents types d'enzyme sont mal documentés. De plus, la qualité ou la cohérence d'une enzyme peut varier entre les lots et les fournisseurs (S. Williams et al., 1995). Ainsi, sélectionne-t-on tous réellement les mêmes cellules appelées « fibroblastes gingivaux » avec les différents protocoles ou enzymes utilisés?

De plus, la mobilité cellulaire semble jouer un rôle important dans de nombreux processus physiologiques et pathologiques de la cavité buccale tels que l'inflammation ; ou

encore la cicatrisation d'une plaie. Il a été établi que cette capacité est régulée par la matrice extracellulaire. Or, aucune expérience sur les mécanismes de la mobilité cellulaire n'a relié ce paramètre au procédé d'isolement des cellules. La méthode de l'explant ne permet-elle pas de sélectionner les cellules migrant le plus vite c'est-à-dire les plus mobiles ?

OBJECTIFS

La première partie de ce travail de thèse a donc consisté en une étude préliminaire sur l'influence de la méthode et des produits utilisés sur l'isolation des fibroblastes gingivaux. Quatre protocoles d'isolation de fibroblastes gingivaux par digestion enzymatique retrouvés dans la littérature ont été comparés à la méthode classique de l'explant. Afin d'observer si le même type de cellule est isolé ; la morphologie cellulaire, les capacités de prolifération et de migration ainsi que le potentiel de différenciation des cellules isolées ont été étudiés.

MATERIEL ET METHODE

Isolation

Toutes les cultures de fibroblastes gingivaux (FG) humains ont été obtenues à partir de biopsies issues de 3 donneurs cliniquement sains et de sexe masculin. Le site de biopsie a pu être mandibulaire (2 donneurs) ou palatin (1 donneur). Tous les patients ont donné leur consentement éclairé conformément à la Déclaration d'Helsinki (1975). La biopsie de gencive de chaque patient a été lavée deux fois dans une solution de PBS 1X (tampon phosphate salin) supplémentée de 1% de pénicilline et 1% de streptomycine ; émincée avec un scalpel stérile afin de n'obtenir que le tissu conjonctif puis a été découpée en cinq morceaux de poids égaux (FIG 1A.).

Milieu de prolifération cellulaire

Pour les différents protocoles qui vont suivre, un milieu de prolifération a été utilisé. Ce milieu est constitué de DMEM-Glutamax à faible teneur en glucose (1g/L) contenant 10% de sérum bovin fœtal (SBF), 1% d'acides aminés non-essentiels MEM 100X (Gibco®), 1% Pénicilline-Streptomycine (10,000 U/mL) (Gibco®), 0,5% Fungizone® Antimycotic (Gibco®) et 50 µg / mL d'acide ascorbique 2L phosphate.

Méthode d’isolation par explant

Dans cette méthode, les 5 sous morceaux de tissu conjonctif ont été placés dans une boîte de culture en plastique de 6 cm² pendant 10 à 15 min avec une goutte de milieu de culture ; pour permettre leur fixation sur la surface en plastique. Ensuite, la boîte a été complètement remplie de milieu de prolifération cellulaire et incubée à 37 ° C dans une atmosphère humidifiée contenant 5% de CO₂. Le milieu a ensuite été remplacé deux fois par semaine jusqu’à obtention de la sortie des cellules et d’une confluence cellulaire à 70 – 80%.

Méthode d’isolation par digestion enzymatique

Dans le procédé enzymatique, les cultures de FG ont été établies en libérant les cellules présentes dans la matrice extracellulaire. Chaque biopsie précédemment coupée en sous morceaux a été placée dans un tube en matière plastique (Tube Eppendorf) contenant chacun une solution de digestion enzymatique. Ainsi, quatre protocoles de digestion enzymatique différents ont été utilisés (voir Tableau N°1).

Tableau N°1- Protocoles de digestion testés

Protocole	Type de collagenase	Autres enzymes	Temps d’incubation	Trypsine/ EDTA 0,05%
1	Type I 3mg/mL	Dispase 4mg/mL	60 min	-
2	Type II 2mg/mL	-	120 min	20 min
3	Type IV 4mg/mL	Dispase 1,38mg/mL Hyaluronidase 0,2mg/mL	45 min	20 min
4	Type IV 2mg/mL	Dispase 1mg/mL	45 min	20 min

Protocole N ° 1

Dans ce protocole, une solution de 3 mg / mL de collagenase de type I (Sigma Aldrich) et 4mg / mL de dispase (Gibco®) a été préparée dans du PBS puis filtrée à 20µm. Les morceaux de biopsie ont été ajoutés dans la solution et laissés pendant 1h dans un incubateur à 37 °C. Les cellules en suspension ont été recueillies en filtrant la solution à travers un tamis cellulaire de 70µm (Falcon) (Gronthos et al., 2000).

Protocole N° 2

Dans ce protocole, une solution de 2 mg / mL de collagénase de type II (Worthington) a été préparée dans du PBS puis filtrée à 20 μ m. Les morceaux de biopsie ont été ajoutés dans la solution et laissés pendant 2h dans un incubateur à 37 °C. De la trypsine / EDTA 0,05% a ensuite été ajoutée pendant 15 min sous orbiteur. Les cellules en suspension ont été recueillies par centrifugation à 300g, lavées et filtrées à travers un tamis cellulaire de 70 μ m (Falcon).

Protocole N° 3

Dans ce protocole, une solution contenant 3,4 mg / mL de collagénase de type IV (Sigma Aldrich), 1,38mg / mL de dispase (Gibco®) et 0,2 mg / mL de hyaluronidase (Sigma Aldrich) a été préparée dans du PBS puis filtrée à 20 μ m. Les morceaux de biopsie ont été ajoutés dans la solution et laissés pendant 45 minutes dans un incubateur à 37 °C. De la trypsine / EDTA 0,05% a ensuite été ajoutée pendant 15 min sous orbiteur. Les cellules en suspension ont été recueillies par centrifugation à 300g, lavées et filtrées à travers un tamis cellulaire de 70 μ m (Falcon).

Protocole N° 4

Dans ce protocole, une solution contenant 2 mg / mL de collagénase de type IV (Sigma Aldrich), 1 mg / mL de dispase (Gibco®) a été préparée dans du PBS puis filtrée à 20 μ m. Les morceaux de biopsie ont été ajoutés dans la solution et laissés pendant 45 minutes dans un incubateur à 37 °C. De la trypsine / EDTA 0,05% a ensuite été ajoutée pendant 15 min sous orbiteur. Les cellules en suspension ont été recueillies par centrifugation à 300g, lavées et filtrées à travers un tamis cellulaire de 70 μ m (Falcon) (Wang et al., 2011).

Les cellules obtenues à partir de ces quatre digestions ont étéensemencées et cultivées dans des boîtes de culture en plastique de 6 cm² à 37 °C et 5% de CO₂ avec le milieu de prolifération précédemment décrit ; afin de promouvoir la croissance cellulaire. Ce milieu a été changé deux fois par semaine jusqu'à obtention d'une confluence cellulaire à 70 – 80%. Les cellules ont ensuite été récoltées en utilisant 0,05% de trypsine / EDTA (Sigma) et amplifiées. Un total de 5 cultures de fibroblastes ont été générées et amplifiées pour chaque patient. Les cellules au passage 1 à 4 ont été utilisées pour les expériences.

Analyse morphologique

La forme des cellules a été observée au cours de la prolifération ainsi qu'à la confluence par microscopie à contraste de phase (Zeiss).

Prolifération

Pour comparer la prolifération des différentes populations obtenues, les cultures cellulaires ont été trypsinisées, comptées etensemencées avec un même nombre de cellules. Pour chaque souche, 2000 cellules ont étéensemencées par puits en triplicate dans une boîte 24 puits. La prolifération a été évaluée à 24, 48, 72 et 96 heures par comptage des cellules sur lame de Malassez.

Temps de doublement (PDT)

Pour comparer le temps de doublement des différentes populations obtenues, les cultures de cellules ont été trypsinisées, comptées etensemencées avec un même nombre de cellules. 20 000 cellules ont étéensemencées par boîte 10 cm² en triplicate pour chaque souche. Après 1 semaine, le nombre total de cellules dans chaque boîte a été compté sur lame de Malassez. Le PDT a été calculé en utilisant l'équation suivante: $X/[(\text{LOG}(\text{NF}-\text{NI}))/\text{LOG}2]$; où "NF" est le nombre final de cellules, "NI" est le nombre initial et "X" le temps en heures. Les temps de doublement ont été réalisés au 2^{ème} passage.

Viabilité cellulaire

À 80% de confluence, une coloration à la Calcéine AM a été réalisée afin d'évaluer la viabilité des cellules dans chaque condition. En bref, les cellules ont été lavées deux fois avec du PBS 1X et ont été ensuite incubées pendant 30 min avec une solution de travail contenant 2 pmol/l de Cell Trace Calcein Rouge-Orange AM (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) comme indiqué par le fournisseur; dans un incubateur à 37 ° C. Les cellules ont été observées et des images numériques ont été enregistrées grâce un microscope à fluorescence Zeiss équipé d'un appareil photo numérique.

Formation de CFU

Pour confirmer la capacité des fibroblastes gingivaux à former des CFU-F (Colony Forming Unit) à partir d'une cellule ; les cellules ont étéensemencées à 50 cellules / cm² dans des

boîtes 6 puits avec un milieu de prolifération classique. Chaque condition ayant été réalisée en duplicate. Après 10 jours, les colonies formées ont été fixées dans une solution de 4 % de paraformaldéhyde (PFA) – 5% saccharose dans du PBS 1X pendant 15 minutes à 4°C ; puis rincées 3 fois avec du PBS. Afin de mieux les visualiser et les compter, les colonies ont été colorées avec du Bleu de Toluidine. Les CFU ayant un diamètre supérieur à 2 mm ont été dénombrées 2 fois dans 5 champs visuels (area) différents sous un objectif x4 (Microscope Zeiss).

Test de cicatrisation ou migration

Pour ce test, les cellules ont été cultivées jusqu'à plus de 90% de confluence dans des boîtes 6 puits. Les cellules ont été rincées avec du PBS 1X et incubées pendant une nuit dans un milieu de prolifération sans SBF dans le but de synchroniser toutes les cellules entre elles. Le jour du début du test, trois blessures/rayures distinctes à travers la monocouche cellulaire ont été réalisées à l'aide de la pointe d'une pipette 200µL stérile en suivant un canevas posé en dessous de la boîte et lisible par transparence. Les cellules ont ensuite été doucement rincées avec du PBS 1X afin d'éliminer les débris cellulaires, et incubées avec du milieu de prolifération frais. Les cellules ont été observées avec un microscope Zeiss équipé d'un appareil photo numérique à t=0h, 3h, 9h, 24h, 48 et 72h. Le taux de cicatrisation ou de fermeture de la plaie a été déterminé en utilisant le logiciel ImageJ.

Tests de différenciation *in vitro*

Voie ostéogénique

Une différenciation ostéogénique a été induite en cultivant les cellules dans du DMEM-Glutamax à faible teneur glucose (1g/L) contenant 10% de SBF, 1% d'acides aminés non-essentiels MEM 100X (Gibco®), 1% Pénicilline-Streptomycine (10,000 U/mL) (Gibco®), 0,5% Fungizone® Antimycotic (Gibco®) ainsi que 50 ng / mL d'acide ascorbique 2L phosphate, 100 nM de dexaméthasone, 10⁻⁷M de vitamine D3 (Sigma-Aldrich) et 10 mM de bêta-glycérophosphate (Sigma-Aldrich). Après 14 jours de culture, la minéralisation a été analysée par une coloration à l'AlizarinRed S (Sigma-Aldrich).

Voie adipogénique

La différenciation adipocytaire a été induite en cultivant les cellules dans du DMEM-Glutamax à forte teneur glucose (4g/L) contenant 10% de SBF, 1% d'acides aminés non-essentiels MEM 100X (Gibco®), 1% Pénicilline-Streptomycine (10,000 U/mL) (Gibco®),

0,5% Fungizone® Antimycotic(Gibco®), 0,5 mM isobutylméthylxanthine, 100 nM de dexaméthasone, 10 µg / mL d'insuline 0,5 et 50 µM d'indométhacine (Sigma-Aldrich). La formation de vacuoles lipidiques a été évaluée par une coloration à l'Oil Red O (Sigma-Aldrich) après 14 jours de culture.

Voie myofibroblastique

Une différenciation myofibroblastique a été induite en cultivant les cellules dans du milieu de prolifération supplémenté en TGF-β (10 ng/mL). Au bout de 5 jours, la différenciation a été mise en évidence par immuno-histochimie de l'ASMA.

Immuno-Histochimie

A 90% de confluence, les cellules ont été fixées en utilisant une solution de PBS 1X contenant 4% de paraformaldéhyde - 5% de saccharose durant 15 minutes à 4°C ; puis perméabilisées en utilisant 0,5% de Triton X-100. Pour bloquer une éventuelle coloration non spécifique, les cellules ont été incubées pendant 20 minutes avec du PBS 1X contenant 1% de BSA / 1 % de glycine à 37 ° C. Puis les cellules ont été mises au contact de l'anticorps primaire à 37 ° C pendant 2 h puis avec l'anticorps secondaire approprié à 37 ° C pendant 1 h. Les noyaux cellulaires ont été colorés au DAPI. Les anticorps utilisés pour la coloration immunologique étaient les suivantes: 1/100 anti-α-SMA (ab5694; ABCAM, Paris, France) et 1/150 anti-collagen I (ab292 ; ABCAM, Paris, France). Les anticorps secondaires étaient AlexaFluor 488 chèvre anti-lapin, AlexaFluor594 chèvre anti-souris (Life Technologies Corporation). Les colorations ont été observées en utilisant un microscope à fluorescence Zeiss Axiovert équipé d'un appareil photo numérique.

Analyse de l'expression des ARNm par qRT-PCR

Les ARN ont été extraits des cultures cellulaires en utilisant une solution Tri Reagent (Molecular Research Center) selon le protocole du fabricant. La concentration des ARN ainsi que la pureté ont été évaluées par spectrophotométrie (Nanodrop, Thermo Scientific, Wilmington, MA, USA). Seuls les échantillons avec un rapport DO260/280 au-dessus de 1,8 ont été utilisés pour cette étude. L'ADNc a été rétro transcrits en utilisant le kit Superscript II (Invitrogen, France) selon les instructions du fabricant. Toutes les amorces ont été conçues et analysées par le logiciel BLASTn (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) puis par RNAfold. Pour les réactions de qRT-PCR, les produits RT ont été dilués et mélangés avec 7,5µL de KapaFastSYBR2X (KapaBiosystems, Wilmington, MA, USA), 3.5 pmoles de primers

(environ 250 nM), pour un volume final de 15µL. L'amplification par PCR en temps réel a été effectuée sur le système Bio-Rad CFX96 (Bio-Rad Laboratories) en utilisant le programme suivant: un cycle à 94°C pendant 3 min, 35 cycles à 95°C pendant 5 s puis 60°C pendant 20 sec, et la réaction achevée après lecture de plaque et analyse de la melting curve de 65°C à 95°C, 5 s pour chaque 0,5°C. Les gènes *SDHA* (succinate deshydrogenase complex subunit A flavoprotein) et *UBC* (ubiquitine C) ont été utilisés en tant que gènes de référence. Des ARN non rétro-transcrits et de l'eau stérile ont été utilisés comme témoins négatifs. Les réactions de PCR ont été réalisées en triplicate pour chaque échantillon. Les données ont été analysées sur la base de la méthode de $2\Delta\Delta C_t$ comparative (CFX Software Manager Version 2.1, Bio-Rad Laboratories). Pour les séquences d'amorces, voir le Tableau N°2.

Tableau N°2- Séquences des primers utilisés

Genes	Sequences (5'>3')	Taille d'amplicons (bp)	Numéro d'accesion
<i>SDHA</i>	F: AGC AAG CTC TAT GGA GAC CT R: TAA TCG TAC TCA TCA ATC CG	200	NM_004168.3
<i>UBC</i>	F: GTG GCA CAG CTA GTT CCG T R: CTT CAC GAA GAT CTG CAT TGT CA	98	NM_021009
<i>COL1A1</i>	F: AAC CAA GGC TGC AAC CTG GA R: GGC TGA GTA GGG TAC ACG CAG G	60	NM_000088.3
<i>COL3</i>	F: AAC CCA CGA ATG CAC TAT CCA R: CGG ACA TAC CGA GGG ACA TG	76	NM_001024630
<i>EDA-FN</i>	F: CAC AGT CAG TGT GGT TGC CT R: CTG TGG ACT GGG TTC CAA TCA	68	NM_212482
<i>EDB-FN</i>	F: CAG TAG TTG CGG CAG GAG AA R: GTA TCC TAC TGA GGA GTC CAC AAA	65	NM_212482
<i>ITG β1</i>	F: GAA GGG TTG CCC TCC AGA R: GCT TGA GCT TCT CTG CTG TT	107	

Analyse statistique

L'analyse statistique a été réalisée en utilisant le test de Bonferroni à l'aide du logiciel PrismGraphPad5 (GraphPad Software Inc, La Jolla, CA, USA). Les résultats sont présentés sous forme de moyenne ± écart-type (SD). Les résultats ont été considérés comme significatifs avec une valeur de $p < 0,05$. (Sur les graphes *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$).

RESULTATS

Dans toutes les conditions testées (explant et digestions enzymatiques), des fibroblastes gingivaux ont pu être obtenus avec succès à partir des biopsies de tissu gingival (FIG 1. B-F).

Paramètres de préparation

Le protocole d'isolation par explant a été le plus rapide à réaliser ; car les différents protocoles de digestion enzymatique mettent un minimum de 2 heures pour obtenir des cellules prêtes à l'ensemencement. De plus, les protocoles de digestion enzymatique ont été les plus opérateur dépendant et ont nécessité une certaine rigueur passant notamment par la filtration des nombreuses solutions préparées. Ainsi, la préparation des protocoles de digestion N°3 et N°4 a été la plus rapide ; les premières cellules ont pu adhérer au plastique après 2h30 de travail contrairement à la méthode des explants qui nécessitait plusieurs jours pour voir des cellules apparaître.

Morphologie

L'observation microscopique des cellules a montré qu'un seul type de morphologie cellulaire « fusiforme » était retrouvé dans toutes les conditions durant la prolifération ou la confluence (FIG 1. G). Des cellules flottantes (nucléées ou non) ou encore des débris cellulaires ont souvent été observés durant la prolifération dans le cas des protocoles enzymatiques ; ou encore la présence de cellules de types « kératinocytes » lors des cultures par explant. Néanmoins, ces cellules ont disparu lors des passages suivants. De plus, en fonction des souches ou encore des conditions d'isolation ; des variations dans la répartition et la densité cellulaire ont pu être observées (FIG 1. C-F).

Prolifération et temps de doublement

La méthode par explant a nécessité 3 semaines de culture primaire afin d'obtenir un taux de confluence supérieur à 80% ; alors que celui-ci fut atteint au bout de 7 jours dans les quatre conditions enzymatiques. Néanmoins, une fois toutes les cultures primaires obtenues, aucune différence significative n'a été observée concernant la prolifération cellulaire à 24, 48, 72 et 96 heures (FIG 1. E). De plus, après le second passage ; des temps de doublement relativement semblables autour de 60 heures ont été retrouvés (FIG 2. A). Ces temps paraissent lents ; mais peuvent s'expliquer par un ensemencement relativement faible des cellules dans leur boîte de culture.

FIGURE N°1

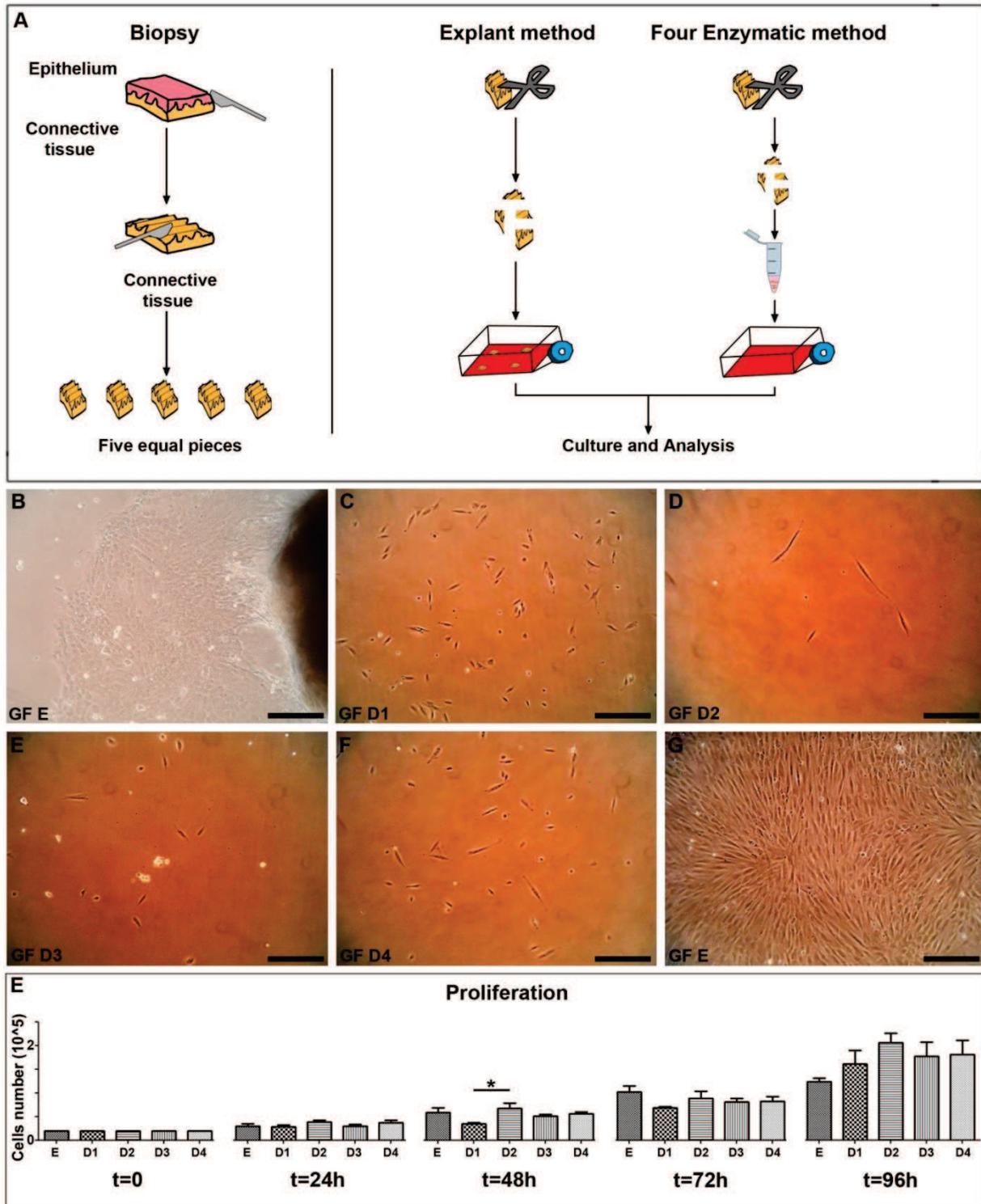


Figure 1. A). Représentation schématique du protocole et des méthodes utilisées pour l'isolation des fibroblastes gingivaux (FG) à partir d'une biopsie de gencive. B). Microphotographie montrant la migration des cellules fibroblastiques et des kératinocytes à partir d'un explant ; après 7 jours. C,D,E,F). Microphotographies montrant les cellules fibroblastiques obtenues après les différents protocoles de digestion au bout d'1 jour. G). Microphotographie montrant la forme des cellules fibroblastiques isolées à partir d'un explant lors de la confluence. Barre d'échelle = 100 μ m. E). Cinétique de prolifération des cellules fibroblastiques obtenues par explant et digestions à t=0, t=24h, t=48h, t=72h et t=96h.

FIGURE N°2

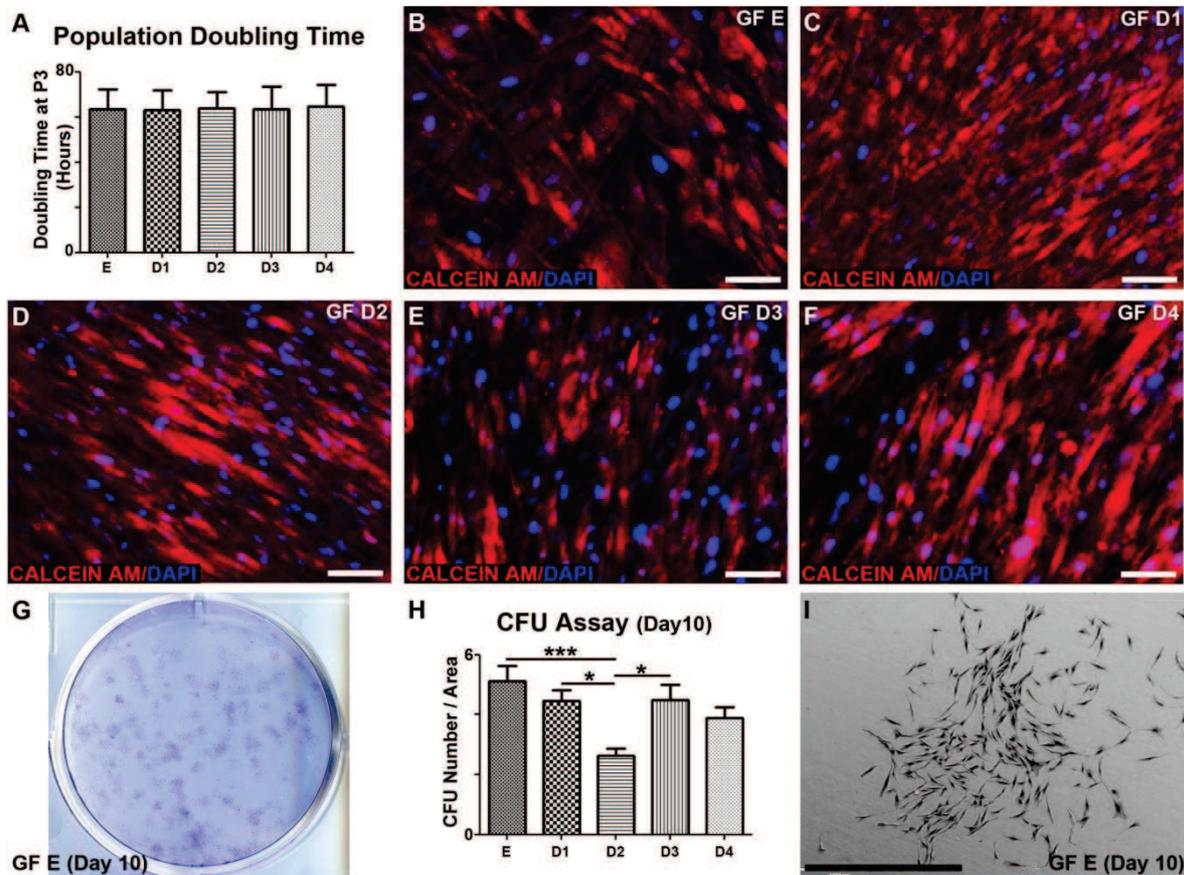


Figure 2. A). Comparaison des temps de doublement moyens après 2 passages (en heures). B,C,D,E et F). Marquage de la viabilité cellulaire à la Calcéine-AM. G). Photographie d'une coloration au Bleu de Toluidine de CFU formées après 10 jours à partir de fibroblastes gingivaux issus d'explant. H). Comparaison du taux moyen de formation de CFU dans les différentes conditions après 10 jours. I). Photographie d'une colonie colorée au Bleu de Toluidine après 10 jours à partir de fibroblastes gingivaux issus d'explant.

Viabilité cellulaire

Après incubation avec la Calcéine AM, les cellules ont donné une fluorescence positive dans toutes les conditions (FIG 2. B-F) ; démontrant ainsi que toutes les populations de fibroblastes générées étaient viables. Cette viabilité a par ailleurs été confirmée lors du passage suivant par une nouvelle prolifération de cellules adhérentes.

Formation de CFU

Un test de formation des CFU a été réalisé afin d'évaluer la capacité des cellules à former des sous-populations. Ainsi, tous les protocoles utilisés ont permis la formation de CFU et aucune différence morphologique n'a été observée parmi les colonies (FIG 2G et I). Néanmoins, la collagénase de type II est associée au plus faible taux de formation de CFU après 10 jours

comparé aux autres conditions. Deux fois moins de colonies ont pu être observées de manière significative, comparée à l'isolation par explant.

Test de cicatrisation ou migration

Des traits de blessures uniformes ont été créés dans toutes les cultures en monocouches, comme décrit précédemment dans le but d'étudier la capacité des cellules à combler la blessure par leur migration. Comme le montre la Figure 3, les fibroblastes gingivaux ont semblé tous commencer leur migration au bout de 9 heures. Les cellules issues d'explant ont présenté une capacité plus rapide à refermer la blessure créée; à 48 h la plaie est quasiment refermée comparée aux autres conditions (FIG 3.A). Des différences entre les protocoles de digestion ont également été notées comme par exemple entre le protocole N°4 et les autres (FIG 3.B et C). Les migrations des cellules issues des protocoles N°2 et 3 étant quasiment semblables à celles du protocole N°1 ; les résultats n'ont pas été inclus dans la figure. Néanmoins, les largeurs des plaies ne semblaient pas hétérogènes. Pour finir, à 72h plus aucune différence ne fut observable.

Matrice extracellulaire

La migration ou encore l'adhésion cellulaire peuvent être liées à la glycoprotéine EDB-FN (Extra Domain-B fibronectine), isoforme de la fibronectine oncofœtale. Après 10 jours, l'expression de l'ARNm EDB-FN a été significativement plus importante dans les cellules obtenues à partir d'explant. De plus, le taux d'ARNm de l'intégrine $\beta 1$, récepteur impliqué dans des phénomènes d'adhésion cellulaire ou encore de réparation tissulaire, a été plus important dans les cellules obtenues à partir d'explant comparés aux protocoles 2,3 et 4. Après 10 jours, l'expression des taux d'ARNm Col1a1 représentatif de la principale molécule sécrétée dans la matrice extra-cellulaire (MEC) ainsi que celui de Col3 pour le collagène de type III, a sensiblement été le même dans les diverses conditions testées (FIG 4A.). Ce résultat a été confirmé par un marquage immuno-histochimique de la protéine Col1a1 au sein des fibroblastes (FIG 4Q-U).

FIGURE N°3

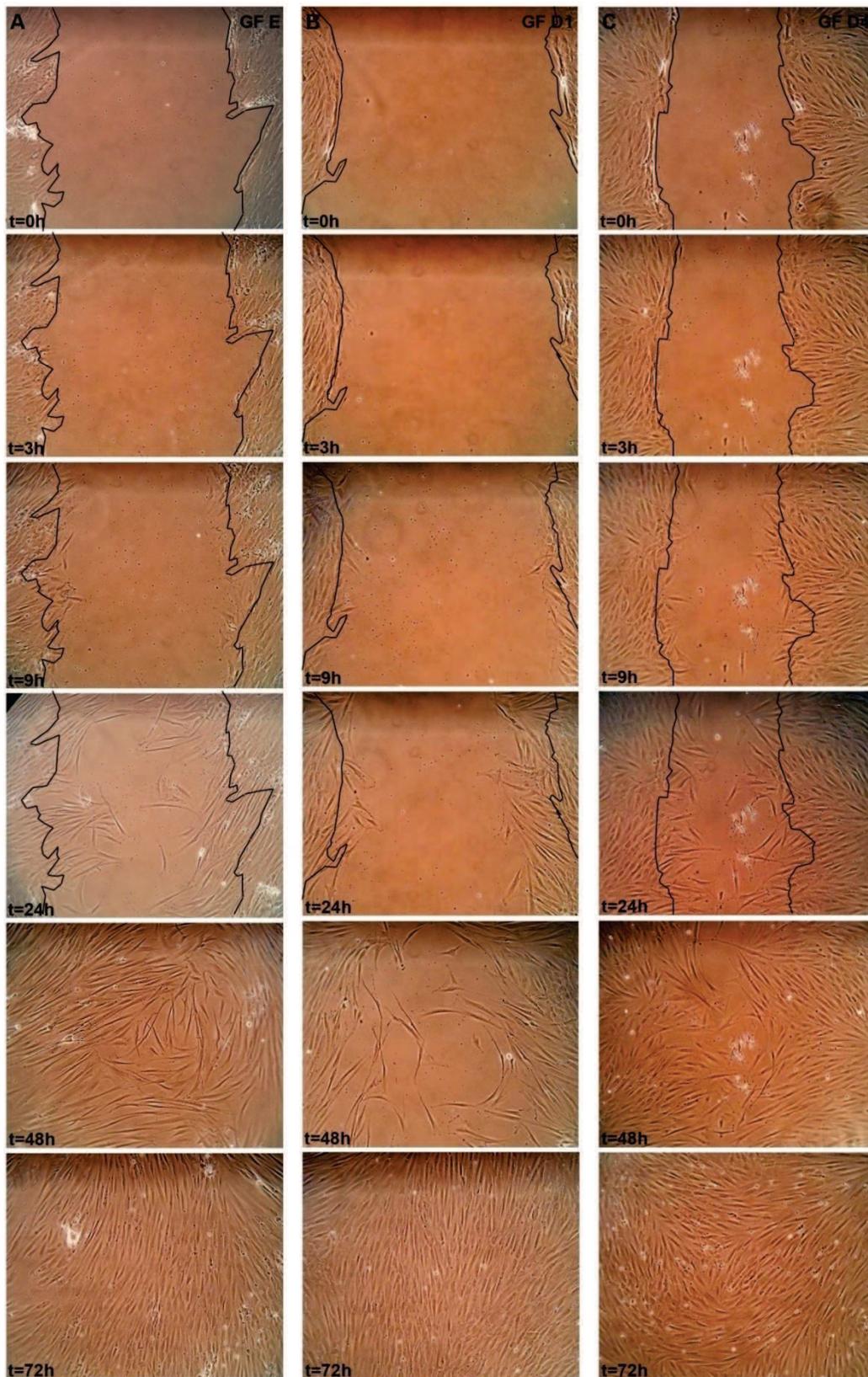


Figure 3. A, B et C). Comparaison des tests de migration entre des cellules obtenues à partir d'explant, ainsi que des protocoles enzymatiques N°1 et N°4 ; grâce à un suivi à t=0, 3, 9, 24, 48 et 72 h en utilisant un microscope à contraste de phase.

FIGURE N°4

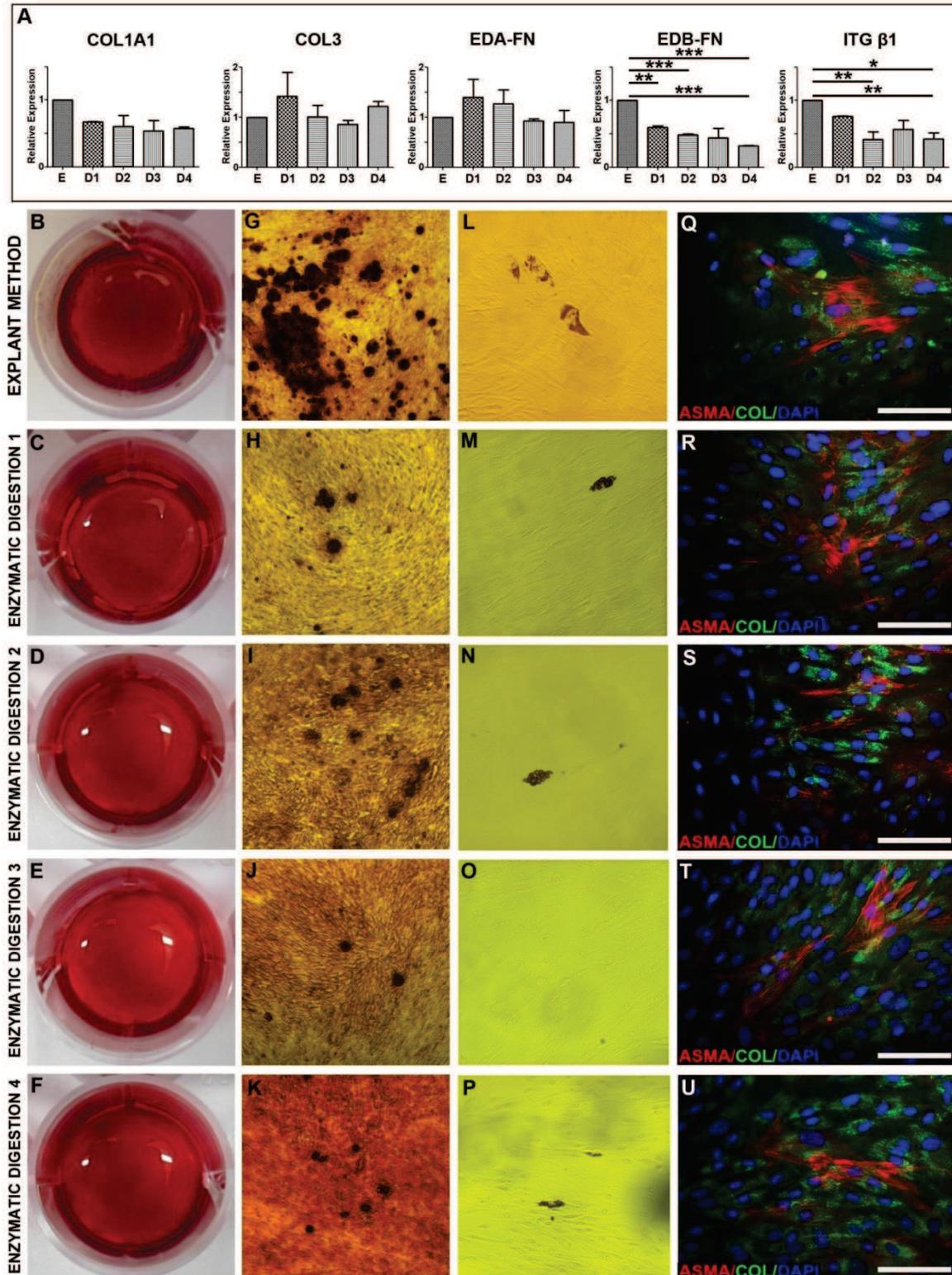


Figure 4. A). Analyse de l'expression des taux d'ARNm des gènes Colla1, Col3, EDA-FN, EDB-FN et Itg-β1 entre les différents protocoles d'isolation cellulaire. B,C,D,E et F). Photographies macroscopiques de la coloration rouge à l'Alizarine Red S dans les différentes conditions. G,H,I,J et K). Photographies microscopiques (x4) de la coloration rouge à l'Alizarine Red S dans les différentes conditions. L,M,N,O et P). Photographies microscopiques (x4) de la coloration rouge des vacuoles lipidiques à l'Oil Red O dans les différentes conditions. Q,R,S,T et U). Immuno-histochimie des protéines Asma et Colla1 dans les différentes conditions.

Tests de différenciation *in vitro*

Après 14 jours de culture, les FG isolés par les méthodes enzymatique ou non-enzymatique ont montré une différenciation comparable dans les lignées adipogéniques et ostéogéniques ; basé sur les colorations histochimiques (FIG 4. B-P). La présence de vacuoles lipidiques a été observée avec parcimonie après induction adipogénique ou encore la présence de dépôts de calcium après induction ostéogénique. Aucune réelle différence morphologique n'a de plus été remarquée. De même, l'immunomarquage « Asma » des cellules n'a montré aucune différence dans la différenciation myofibroblastique dans les différentes conditions.

CONCLUSION

Dans le but d'obtenir des cellules souches gingivales à utiliser en médecine régénérative et en ingénierie tissulaire, un consensus doit être établi en ce qui concerne la méthode d'isolation des fibroblastes à partir de biopsie de gencive. Ainsi, cette étude préliminaire a tenté d'évaluer l'influence de la méthodologie d'isolation sur les propriétés des cellules obtenues ou encore leur potentiel de différenciation. Cette étude est donc la première à comparer plusieurs méthodes d'isolation enzymatique avec la méthode empirique de l'explant.

Des précédentes études ont décrit des protocoles détaillés pour l'isolation des cellules souches mésenchymateuses de la pulpe, du cordon ombilical ou encore de la gencive utilisant différents types de collagénase ; pour isoler les cellules à partir de biopsies. Le recours à une enzyme est une méthode alternative ; qui d'après certains auteurs, serait chère et augmenterait par conséquent sensiblement le coût d'obtention des cellules ou encore pourrait induire des dommages cellulaires. Cette solution est néanmoins largement utilisée dans la plupart des laboratoires. Ainsi, l'utilisation d'un procédé chimique modifie-t-il donc la qualité et la quantité d'isolation des cellules. L'objectif est de définir la méthode d'isolation la plus efficace et pratique, avec un nombre plus élevé de cellules isolées, rapide et faible coût. Dans cette étude, nous avons comparé 5 méthodes d'isolation différentes ; utilisant les collagénases de type I, II et IV avec des concentrations différentes.

La méthode de l'explant est une méthode non chimique empirique appropriée à des fins cliniques et demandant peu de main-d'œuvre. Le recours à une méthode enzymatique permet indéniablement d'obtenir des cellules dans un laps de temps plus court. Mais, la

présence de cellules flottante associées aux cultures; semblent démontrer la perte d'un certain nombre de cellules au cours du processus de préparation. Néanmoins une fois isolées ; aucune différence de prolifération ou de temps de doublement n'a été distingué entre les différents protocoles. Les cellules obtenues sont viables, présentent la capacité à former des CFU et sont capables de se différencier dans les lignées adipo-, ostéogénique ou encore myofibroblastique.

De plus, dans cette étude, les résultats suggèrent que les cellules obtenues à partir d'explant présentent une meilleure capacité de migration par rapport à la digestion chimique. Néanmoins, de nouvelles expériences complémentaires semblent nécessaires.

II^{ème} PARTIE**ETUDE DE L'ORIGINE EMBRYOLOGIQUE DES FIBROBLASTES GINGIVAUX (GF) ET CELLULES SOUCHES GINGIVALES HUMAINES (CSGH)****I- RÉSUMÉ DE L'ARTICLE: « CHARACTERISATION OF HUMAN GINGIVAL NEURAL CREST-DERIVED STEM CELLS IN MONOLAYER AND NEUROSPHERE CULTURES »**

Les crêtes neurales (CN) et plus particulièrement les CN céphaliques possèdent une capacité de pluripotence remarquable, permettant de générer une variété de tissus donnant par la suite des types cellulaires dérivés des feuilletts ectodermique (neurones, cellules de Schwann, mélanocytes) et mésodermique (ostéoblastes, adipocytes,...). L'étude *in vitro* de cette pluripotence montre que ces potentiels de différenciation sont variables mais hiérarchisés en fonction des variétés cellulaires générées. A l'âge adulte, les CN (post-migratoires) acquièrent un phénotype différencié plus spécialisé (chondrocyte, ostéoblaste, fibroblastes...) ; néanmoins leur capacité de pluripotence semble pouvoir être réactivée.

Récemment, des cellules issues de la crête neurale (CN) ayant conservées leur caractère souche après leur migration et pouvant être différenciées dans des dérivatifs appartenant aux feuilletts ectodermique et mésodermique ont été observées dans différents tissus de l'organisme à l'âge adulte (Kaltschmidt et al., 2011). L'étude *in vivo* de ces cellules souches dérivées de la crête neurale (CSCN) est possible par le traçage de marqueurs spécifiques exprimés par ces cellules lors des stades précoces du développement. Ces cellules peuvent recréer différents lignages cellulaires *in vivo*. Ainsi, des cellules souches ont été mises en évidence dans de nombreux sites de la sphère oro-faciale (follicules pileux de la peau du visage, pulpe dentaire (Stevens et al., 2008) ou encore ligament parodontal (Coura et al., 2008). Cependant, si la multipotence et l'auto-renouvellement de ces cellules ont été confirmés, des différences intrinsèques ont pu être établies entre les CSCN en fonction de la localisation et du stade de développement de l'organisme à partir desquels elles ont été isolées. L'utilisation de ce type de cellules en thérapie cellulaire semble être un réel atout. Cependant, ces cellules étant rares et d'isolation souvent complexe ; l'utilisation de la gencive comme alternative a été proposée au cours de ce travail pour les raisons présentées dans la première partie de cette thèse.

Les CSCN possèdent des marqueurs spécifiques, qui peuvent toutefois varier en fonction du type cellulaire, tel que la nestine, les facteurs de transcription Snail1, Sox10 ou

encore Twist1 et présentent la capacité d'être cultivées en suspension sous forme d'amas sphériques dans un milieu « sans sérum » ; enrichi en bFGF et de l'EGF. Un travail a montré que les cellules SKP, CSCN localisées dans les papilles des follicules pileux de la face, possédaient de telles facultés et à l'image des cellules souches neurales, avait la capacité de se différencier en neurones et cellules gliales *in vivo* (J G Toma et al., 2001; Jean G Toma et al., 2005).

Ainsi, la réalisation d'une telle approche sur les cellules souches dérivées de la gencive tendrait à confirmer l'origine neurectodermique de ces cellules.

OBJECTIFS

Le premier objectif de ce travail a consisté à confirmer la présence *in vivo* de cellules dérivées de crêtes neurales au sein d'un tissu adulte tel que la gencive. Pour ce faire un modèle de souris transgéniques Wnt1- Cre / R26RYFP âgées de 8 mois a été utilisé afin de réaliser des biopsies et détecter ainsi l'éventuelle présence de cellules post-migratoires dérivées des crêtes neurales. Ce type de souris permet l'observation de l'expression d'une protéine jaune fluorescente (YFP) sous le contrôle du promoteur Wnt1 durant le développement embryonnaire. Ainsi, à la différence de la biopsie de la paroi abdominale ; des CSCN marquées en jaune ont été observées au sein de la gencive sous microscopie confocale.

Le second objectif consistait à vérifier l'expression de gènes relatifs aux CN (nestine, Snai1, Twist1, Pax3, Sox9 et FoxD3) par les fibroblastes gingivaux (FG) et les cellules souches gingivales (CSG) chez l'homme.

Le troisième objectif, a été de montrer qu'à l'image des cellules SKP ; les fibroblastes (FG) et les cellules souches gingivales (CSG) isolées chez l'Homme pouvaient être capables d'être cultivés sous forme d'amas sphériques appelés « neurosphères ». A cet effet, plusieurs milieux de culture « sans sérum » retrouvés dans la littérature ont été testés et comparés.

Ensuite, plusieurs paramètres liés à cette culture ont permis d'évaluer :

- si les fibroblastes gingivaux cultivés sous forme de sphères partageaient bien les caractéristiques classiques retrouvées dans les neurosphères
- si les fibroblastes gingivaux cultivés sous forme de sphères conservaient malgré tout leur phénotype fibroblastique comparé une culture classique en monocouche

- si leur potentiel de différenciation se modifiait, après passage sous forme de sphères, vers une voie neuronale

A cet effet, et afin de différencier qui de la culture en 3 dimensions ou du milieu sans sérum avait un impact sur les cellules ; trois conditions de culture ont été réalisées :

- Culture en monocouche en milieu classique de prolifération contenant du sérum
- Culture en monocouche dans le milieu sans sérum « NS4 »
- Culture en 3 dimensions sous forme de sphères en suspension dans le milieu sans sérum « NS4 »

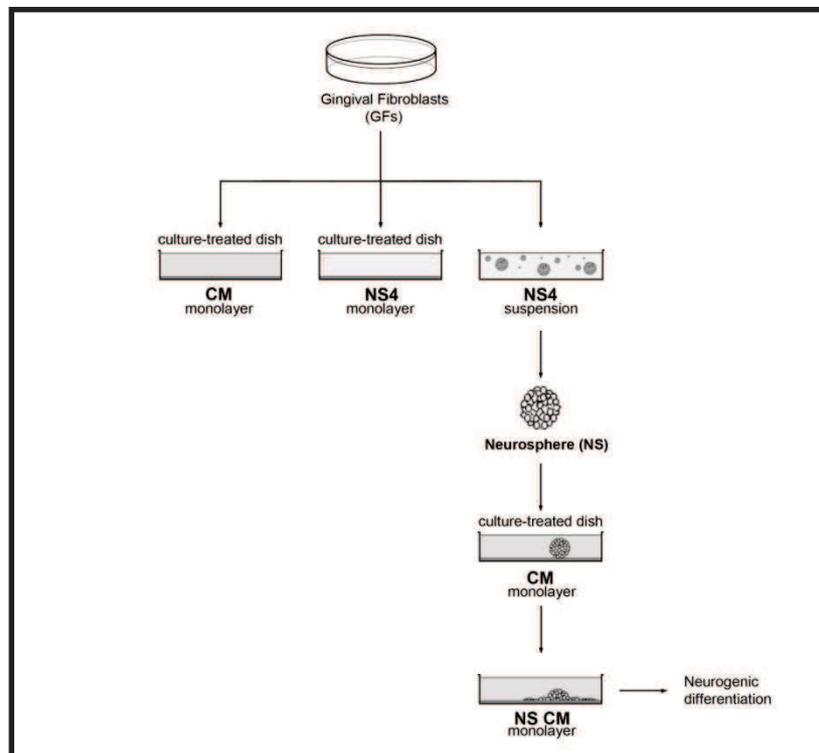


Figure 14 Schéma des différentes conditions de mises en culture

RESULTATS

Premièrement, les fibroblastes gingivaux ainsi que les cellules souches gingivales sont capables d'être cultivées en 3 dimensions sous forme de neurosphères dans des conditions de culture « sans sérum ». Le milieu appelé « NS4 » enrichi en EGF et bFGF utilisé pour les cellules SKP, a présenté la plus grande capacité à former des sphères.

Deuxièmement, il a été montré que certains gènes ou protéines semblent être modulés par les conditions de culture. L'expression des protéines fibronectine et vimentine, produites par les fibroblastes ou encore les cellules souches mésenchymateuses, ainsi que la β 3-tubuline est indépendante du milieu de culture. Alors que le recours au milieu NS4 « sans sérum » induit l'expression de la nestine, indépendamment du type de culture: 3 dimensions ou monocouche. De même, le milieu NS4 semble éteindre l'expression du collagène de type I, marqueur spécifique du phénotype fibroblastique.

Troisièmement, lors de leur passage sous forme de sphères, les cellules ont montré une augmentation significative de l'expression des gènes liés aux CN. Le passage des cellules sous forme de sphères semblent favoriser leur potentiel de différenciation neuronale. La formation de neurosphères est régulée par la Connexin 43 ainsi que par des jonctions cellulaires Calcium dépendantes, certainement des cadhérines.

Ainsi, les cellules fibroblastiques de la gencive humaine et les cellules souches qui en dérivent peuvent fournir une source efficace de cellules dérivées des CN après culture sous forme de sphères flottantes. En plus des applications thérapeutiques, les cellules gingivales peuvent fournir un nouvel outil pour étudier les mécanismes *in vitro* de différenciation CN-like ou encore les maladies affectant les dérivés CN.

CHARACTERISATION OF HUMAN GINGIVAL NEURAL CREST-DERIVED STEM CELLS IN MONOLAYER AND NEUROSPHERE CULTURES

B.P. Fournier^{1§}, L.S. Loison-Robert^{1§}, F.C. Ferré¹, G.R. Owen², H. Larjava² and L. Häkkinen^{2*}

¹Cordeliers Research Center, Team “Oral Molecular Physiopathology”, INSERM UMR1138, Paris Descartes and Paris Diderot University, Paris, France.

²Department of Oral Biological and Medical Sciences, Faculty of Dentistry, University of British Columbia, Vancouver, BC, Canada.

§Both authors contributed equally to this work.

Abstract

Neural crest (NC)-derived stem cells (NCSC) have an exceptionally wide differentiation potential, but their use in regenerative therapy has been hampered by their scarcity in adult tissues and complex isolation protocols. Human oral mucosal gingiva may provide an attractive source of these cells as it contains NC-derived cells, the tissue is easily accessible and wound healing is fast and scarless with very little morbidity. To this end, we first investigated whether NC-derived cells are retained in adult gingiva by examining 8-months-old NC-reporter Wnt1-Cre/R26RYFP mice. We then hypothesised that gingival cell NC-like phenotype can be further enhanced by floating neurosphere cultures generated from standard human gingival fibroblast (GF) and pooled CFU-F (GSC) cultures. Findings showed that NC-derived cells are retained in the gingival connective tissue of aged mice. Human GFs and GSCs expressed NC-related genes nestin, Snai1, Twist1, Pax3, Sox9 and FoxD3, and generated neurospheres. This was mediated *via* calcium- and connexin 43-dependent cell communication, which is similar to neurospheres formed by neural progenitors. Cells in the spheres showed significantly increased expression of NC-related genes, and down regulation of fibroblast-related type I collagen. Structurally, the neurospheres were polarised with nestin positive cells located on the outer layers underlined with an extracellular matrix rich in molecules typical to embryonic NC. Sphere-derived cells expressed significantly elevated levels of neural markers, and differentiated into Tau, neurofilament-M and GFAP-positive cells suggesting neural differentiation potential. Thus, human GF and GSC cultures may provide an efficient source of NC-derived cells *via* enrichment by floating sphere cultures.

Keywords: Neural crest, stem cell, oral mucosa, gingiva, neurosphere, gene expression, differentiation, neural differentiation.

*Address for correspondence:

Dr. Lari Häkkinen,
University of British Columbia,
Faculty of Dentistry,
Department of Oral Biological and Medical Sciences,
2199 Wesbrook Mall,
Vancouver, BC,
V6T 1Z3 Canada

Telephone number: +604-822-0096

Email: lhakkine@dentistry.ubc.ca

Introduction

Many of the oral tissues, including dental pulp, periodontal ligament, buccal mucosa and gingiva contain tissue specific mesenchymal progenitor cells that have self-renewal and multipotent differentiation capacity (Fournier *et al.*, 2010; Fournier *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2009). Potential use of these adult oral progenitor cells in cellular therapy has attracted considerable interest due to their easy access. Gingiva in particular, the part of oral mucosa that closely surrounds the teeth, is an attractive source of progenitor cells, as tissue biopsies for cell isolation are easy to collect without the need for tooth extraction. Furthermore, gingival tissue has a distinct capacity for fast and scarless wound healing following biopsy, and donors experience very little morbidity (Glim *et al.*, 2013; Häkkinen *et al.*, 2014). The therapeutic potential of gingival tissue has also been recognised *in vivo* (Häkkinen *et al.*, 2014). For instance, different gingival tissue grafting procedures within oral cavity have been used in clinical practice for decades. In addition, gingival grafts have been successful in extraoral sites. For example, full-thickness autologous grafts from palatal gingival mucosa have been used for eyelid reconstruction with good clinical outcomes (Siegel, 1985; Weinberg *et al.*, 2007), and in animal models, gingival fibroblasts have been successful in tracheal or vascular repair (Durand *et al.*, 2012; Kobayashi *et al.*, 2007). In spite of recent progress in the field, identification and characterisation of tissue specific progenitor cells and their relationship with fibroblasts in gingiva remains elusive. Therefore, better understanding of the properties of gingival cells would be needed to further enhance their prospect in cellular therapies (Häkkinen *et al.*, 2014).

Certain tissues in the body, including most of the oral and craniofacial tissues, originate from the neural crest (NC) migrating cells during development (Barbu *et al.*, 1986; Chai *et al.*, 2000; Gammill and Bronner-Fraser, 2003; Ibarretxe *et al.*, 2012; Kaltschmidt *et al.*, 2012; La Noce *et al.*, 2014; Le Douarin *et al.*, 2008; Le Douarin, 2012; Le Lièvre and Le Douarin, 1975). As a result, daughter cells of these NC cells (post-migratory NC cells) are found in the adult tissues. These include fibroblasts and various tissue-specific progenitor cell populations (Le Douarin *et al.*, 2008; Yoshida *et al.*, 2008). The NC origin has been particularly associated with distinct phenotype of tissue-specific progenitor cells, which include so-called skin-derived precursor cells (SKP) present in facial skin, and post-migratory NC stem cells (pNCSCs) (Fernandes *et al.*, 2008). For instance, these cells have exceptionally wide

differentiation capacity into various ectomesenchymal cell types, *i.e.* mesenchymal lineages such as fibroblasts, myofibroblasts, osteoblasts, chondroblasts, myoblasts and adipocytes, and to neural lineages that include neurons and glial cells (Dupin *et al.*, 2007; Kaltschmidt *et al.*, 2012). Thus, when efficiently isolated from tissue, the NC-derived cells may provide remarkable versatility for tissue regenerative modalities. Best characterised tissue niches for pNCSCs include the bone marrow and hair follicles in skin (Dupin and Sommer, 2012; Hunt *et al.*, 2009; Kaltschmidt *et al.*, 2012; Sieber-Blum *et al.*, 2004). They have also been found in tooth-related tissues in the oral cavity, such as dental pulp (Arthur *et al.*, 2008; Chai *et al.*, 2000; Stevens *et al.*, 2008) and periodontal ligament (Kawanabe *et al.*, 2010; Widera *et al.*, 2007). However, cells with similar properties can also be isolated from skin areas lacking hair follicles, such as neonatal foreskin (Toma *et al.*, 2005), or oral locations not directly associated with teeth, namely buccal (cheek) mucosa and lamina propria of hard palate (Dong *et al.*, 2010; Kaltschmidt *et al.*, 2012; Weber *et al.*, 2015; Widera *et al.*, 2009). While NC cells are abundantly found in the dental pulp (Arthur *et al.*, 2008; Chai *et al.*, 2000; Stevens *et al.*, 2008), they appear to be rare in most other adult tissues (Nagoshi *et al.*, 2008), and their abundance further decreases during aging (Hunt *et al.*, 2009). Lineage-tracing of NC-derived cells in juvenile transgenic Wnt1-reporter mice gingiva has indicated that majority of connective tissue cells also in gingiva are of NC origin (Xu *et al.*, 2013), but it is unclear if these cells are retained during aging *in vivo*. Additionally, in standard cultures of human gingival connective tissue cells, a large proportion of cells have been reported to express neural and NC-related genes, including nestin and p75 low-affinity neurotrophin receptor (p75NTR), and possess both mesodermal and neurogenic differentiation capacity when appropriately stimulated (Ganz *et al.*, 2014; Marynka-Kalmani *et al.*, 2010). Thus, gingival connective tissue may contain NC-derived cells, but their NC-related properties have not been characterised in detail.

A defining feature of NC-related progenitor cells is that, contrary to their mesoderm-derived counterparts, they constitutively express neural-progenitor markers, such as nestin, and possess high neurogenic differentiation potential when appropriately stimulated (Ibarretxe *et al.*, 2012). Recent studies have shown that floating neurosphere cultures, originally developed to isolate and expand neural stem cells, may be effective in isolating and selecting these progenitors from various tissues, including skin, periodontal ligament and dental pulp (Abe *et al.*, 2012; Techawattanawisal *et al.*, 2007; Toma *et al.*, 2001). In this protocol, cells are enzymatically released from the tissue and then cultured as floating spheres in serum-free medium supplemented with EGF and FGF2 (Pastrana *et al.*, 2011; Toma *et al.*, 2001). This is in contrast with traditional fibroblast or mesenchymal stem cell cultures where cells are cultured in serum-containing media as plastic adherent cells (Fournier *et al.*, 2013; Häkkinen *et al.*, 2014). Although valuable in selecting NC-derived progenitors, floating sphere cultures established from cells that are directly released from tissue by enzymatic digestion is impractical and inefficient in large-scale applications.

In skin, frequency of NC-related progenitors is also strongly reduced during aging limiting the availability of appropriate donor material (Gago *et al.*, 2009; Hunt *et al.*, 2009). Therefore, in the present study, we wanted to find out whether NC-derived cells are retained in adult gingiva. To this end, we studied the presence of these cells in gingiva in aged (8 months old) mice. In addition, we tested for the first time whether human gingiva contains NC-like cells that can be propagated from standard plastic adherent cell cultures to form neurospheres. To this end, we assessed the NC-like characteristics of standard cultures of human gingival fibroblasts (GFs) and pooled CFU-F cultures (GSC) generated from the GF cultures. We have previously shown that such GSC cultures contain progenitor cells with multipotent differentiation potential (Fournier *et al.*, 2013). We then evaluated whether these cultures can be used to generate floating spheres, if they share characteristics with classical neurospheres that have been used to enrich and test NC-like stem cell potential, and if neurosphere generation can be used to enhance the NC-like phenotype of the gingival cells. Finally, phenotype of the human gingival sphere-derived cells was analysed and compared to their plastic adherent counterparts, and their neural differentiation potential tested.

Materials and Methods

Detection of post-migratory neural crest-derived cells in mouse tissues

Marginal and attached gingiva from maxilla and abdominal skin biopsies were collected from two 8-month-old male Wnt1-Cre/R26RYFP mice that were engineered to express yellow fluorescent protein (YFP) under the control of Wnt1 promoter during embryonic development. In these adult mice, cells that originate from the NC during development are permanently labelled with YFP representing post-migratory NC cells (a generous gift from Dr. Fabio Rossi, University of British Columbia, Vancouver, BC, Canada) (Lemos *et al.*, 2012). Tissue samples were immediately fixed in 4 % paraformaldehyde at room temperature for 2 h and then placed in O.C.T. compound (Tissue-Tek, Torrance, CA, USA) and snap-frozen in liquid nitrogen. Frozen section (5 µm) were cut and stored at -86 °C. Tissue sections were observed using a Leica SP5X White Light Laser Confocal Microscope DMI 5000 equipped with an YFP filter (excitation wavelength 490-510 nm; Leica Microsystems Inc., Concord, ON, Canada). Procedures were reviewed and approved by the University of British Columbia Animal Ethics Committee.

Cell culture

Human gingival fibroblast (GF) cultures were established from biopsies of clinically healthy attached gingiva from three healthy female donors (average age 13 years) undergoing gingival surgery for tooth exposure for orthodontic treatment. All patients gave their informed consent according to the Helsinki Declaration (1975). The procedures were reviewed and approved by the University of British Columbia Clinical Research Ethics Board. GF cultures were established either as explant cultures or by

Table 1. Composition of culture media used for floating sphere formation.

Medium	Composition							
	Basal Medium	Glutamine ¹ (mM)	EGF ¹ (ng/mL)	FGF2 ¹ (ng/mL)	Insulin ¹ (µg/mL)	Transferrin ¹ (µg/mL)	N2 ² (%)	B27 ² (%)
NS1 (1)	Neurobasal medium ²	2		20			2	
NS2 (2)	DMEM/F12 ¹		20	20				
NS3 (3)	DMEM/F12 ¹	2	20	20	25	100		
NS4 (4)	DMEM/F12 ¹		20	40				2
NP1	NPM TM (Serum-free Neural Progenitor Maintenance Medium) ³							
NP2	NPD TM (Neural Progenitor Differentiation Medium BulletKit) ³							

¹Gibco/Life Technologies Corporation, Grand Island, NY, USA.

²Invitrogen/Life Technologies Corporation, Grand Island, NY, USA.

³Lonza, Basel, Switzerland.

releasing the cells from the biopsies by enzyme treatment (enzymatic method). In the explant method, biopsies were minced with a sterile scalpel and then placed in a culture plate. For the enzymatic method, the biopsies were digested with collagenase II (Worthington) at 37 °C for 2 h. The released cells were collected by centrifugation and washed before seeding. The cells were routinely maintained in the classical low glucose DMEM containing 10 % heat-inactivated foetal bovine serum (FBS), 100 U/mL of penicillin G, 100 µg/mL streptomycin sulphate and 0.025 mg/mL amphotericin B mixture (CM; Life Technologies Corporation, Burlington, ON, Canada) and 50 µg/mL ascorbic acid phosphate (Wako Chemicals, Richmond, VA, USA) to promote cell growth (Jung *et al.*, 2010; Kuznetsov *et al.*, 1997). To generate CFU-F enriched cultures (GSCs, gingival stem cells), single-cell suspensions were seeded at low density (< 100 cells/cm²) on 10 cm Petri dishes and cultured as above until colonies appeared (Fournier *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2009). All the colonies within each plate were then trypsinised, pooled and further expanded in culture as described above. A total of three GSC cultures were generated and used for the study, each of them having its parental fibroblast culture (GF) counterpart. Cells at passage 2-5 were used for the experiments.

Floating sphere cultures

To investigate the capacity of the cells to generate neurosphere-like structures, monolayer cultures were trypsinised, collected by centrifugation, and 25,000 cells/mL were seeded on 6 cm non-tissue culture-treated dishes. First, six different culture media previously shown to support neurosphere formation (Table 1) were tested for their ability to generate floating spheres using GFs. Typically, the floating spheres were formed between the second and third day after seeding, and the sphere formation efficiency was scored at day five by a single examiner. The score (0-4) was based on the number and size of the spheres that formed (0: no spheres; 1: few small spheres; 2: some, mostly small spheres; 3: numerous, mostly small spheres; 4: numerous, very large spheres). The best medium (NS4; Table 1) was then used for more detailed characterisation of the floating spheres (see below). To assess sphere-forming efficiency in more detail, in a set of experiments, cells were seeded in NS4 medium on 6 cm

non-tissue culture-treated dishes, and number of spheres formed after day five was calculated in five parallel phase contrast microscope fields *per* well using a ×4 objective. For a set of experiments assessing importance of calcium (Ca²⁺)-dependent cell-cell contacts on sphere formation, the culture medium was depleted of Ca²⁺ using a chelator (Chelex[®] 100; Bio-Rad Laboratories, Mississauga, ON, Canada) as previously described (Price *et al.*, 1983; Swierenga and Auersperg, 1982). The floating spheres used for these experiments were collected at day five.

Neural differentiation assay

Neural differentiation was carried out in DMEM containing 10 % FBS and retinoic acid (10⁻⁷ M; Sigma-Aldrich; NeuM1) for 10 d or in DMEM/F12 supplemented with 1 % N2 culture supplement and FGF2 (4 ng/mL; Gibco/Life Technologies, Grand Island, NY, USA; NeuM2) for 3 weeks. Differentiation was assessed by immunostaining and qRT-PCR (see below).

Analysis of mRNA expression by qRT-PCR and RT-PCR

Total RNA was extracted from cultured cells using NucleoSpin[®] RNA II kit and treated with rDNase (Macherey-Nagel, Duren, Germany) according to the manufacturer's protocol. Total RNA concentration and purity was measured by spectrophotometry (Nanodrop, Thermo Scientific, Wilmington, MA, USA) and samples with OD260/280 ratio above 1.8 were used for the study. cDNA was synthesised using iScriptTM Select cDNA Synthesis Kit (Bio-Rad Laboratories) according to the manufacturer's instructions. All primers were designed on the boundaries of exons when possible, and analysed by BLASTn software (Web ref. 1) for specificity. The primers were designed to yield a target sequence that was 75-250 base pairs long with a GC content between 40-60 %. RNA folding was tested using the RNAfold tool (Web ref. 2) to avoid secondary structures when possible. Efficiency of target amplification was set to 90-105 % based on optimisation using a dilution series of cDNA for each primer while standard curves were made. For the qRT-PCR reactions, diluted RT products were mixed with 7.5 µL of 2X Kapa SYBR Fast qPCR (Kapa Biosystems, Wilmington, MA, USA) mix and 5 pmol primers, for a final volume of 15 µL. Real-time PCR amplification was

Table 2. PCR primer sequences used for the study.

Genes	Primers sequences (5'>3')	Size (bp)	Accession number
<i>β3-Tubulin</i>	F: TCTCACAAGTACGTGCCTCG R: CAGGCAGTCGCAGTTTTCAC	225	NM_001197181.1 NM_006086.3
<i>COL1A1</i>	F: AACCAAGGCTGCAACCTGGA R: GGCTGAGTAGGGTACACGCAGG	80	NM_000088.3
<i>Connexin 43</i>	F: AGCAGTCTGCCTTTCGTTGTA R: GATTGGGAAAGACTTGTTCATAGCAG	73	NM_000165.4
<i>FOXD3</i>	F : AGTGAAGCCGCCTTACTCGTACAT R : AGGAAGCTGCCGTTGTCGAACAT	265	NM_012183.2
<i>GAPDH</i>	F: CTTTGTCAAGCTCATTTCCTGGTA R: GGCCATGAGGTCCACCA	70	NM_002046
<i>MAP2</i>	F: CCTGCCCTAGCAGACTAAA R: TGGTACTCCGTCCTTGTTC	120	NM_001039538.1
<i>Nestin</i>	F: CAGCGTTGGAACAGAGGTTGG R: GGCTGGCACAGGTGTCTCAAG	392	NM_006617.1
<i>PAX3</i>	F: TGTTCACTGGGAAATCCGAGA R: AGCTGTTCTGCTGTGAAGGTGGTT	309	NM_181457.3
<i>P75NTR</i>	F: TGGCCTACATAGCCTTCAAGA R: GAGATGCCACTGTCGCTGT	124	NM_002507.3
<i>SDHA</i>	F: AGCAAGCTCTATGGAGACCT R: TAATCGTACTCATCAATCCG	199	NM_004168.3
<i>SNAIL</i>	F: TCGGAAGCCTAACTACAGCGA R: AGATGAGCATTGGCAGCGAG	140	NM_005985.3
<i>SOX9</i>	F: CTGIAGGCGATCTGTTGGGG R: AGCGAACGCACATCAAGAC	85	NM_000346.3
<i>S100B</i>	F: GGGAGACAAGCACAAGCTGA R: CCTCCTGCTCTTTGATTTCCTCTA	93	NM_006272.2
<i>Tenascin-C</i>	F: CAACCTGATGGGGAGATATGGGGA R: GAGTGTTCTGTTGCCCTTCCAG	77	XM_005251975.2
<i>TWIST1</i>	F: TGCAGCTATGTGGCTCACGA R: CCCACGCCCTGTTTCTTTGA	266	NM_000474.3
<i>UBC</i>	F: GTGGCACAGCTAGTTCCGT R: CTTACGAAGATCTGCATTGTCA	96	NM_021009.6

performed on the CFX96 System (Bio-Rad Laboratories) using the following program: one cycle at 94 °C for 3 min, 35 cycles at 95 °C for 5 s, gene-specific annealing for 20 s, and reaction completion with reading plate and a melt curve analysis from 65 °C to 95 °C, 5 s for each 0.5 °C. Amplification reactions were conducted for target genes with β -actin (BACT), succinate dehydrogenase complex subunit A flavoprotein (SDHA) and ubiquitin C (UBC) as reference genes. For a given qRT-PCR experiment, at least two reference genes were chosen based on the Bio-Rad CFX manager software. Non-transcribed RNA samples and a water control were used as negative controls. The PCR reactions were performed in triplicate for each sample. Gene expression analysis was performed using three parallel cell lines. The data was analysed based on the comparative $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method (CFX Manager Software Version 2.1, Bio-Rad Laboratories). For primer sequences, see Table 2. In a set of experiments, the PCR products were also run on agarose gels (1.5 %) to confirm the correct amplicon size.

Immunostaining

Immunostainings were performed using two monoclonal anti-nestin antibodies (clone 10C2, EMD Millipore/Chemicon, Billerica, MA, USA; MAB1259, R&D Systems, Minneapolis, MN, USA), polyclonal (F3648,

Sigma-Aldrich) and monoclonal (HFN 7.1, Developmental Studies Hybridoma Bank, Iowa City, IA, USA) anti-fibronectin antibodies, and two monoclonal anti- β 3-tubulin antibodies (MAB1195, R&D Systems; E7, Developmental Studies Hybridoma Bank). Both nestin, fibronectin and β 3-tubulin antibodies gave identical results, respectively (data not shown). Immunostainings were also performed using anti-Tau protein (EMD Millipore/Chemicon), anti-neurofilament-M (RT97, Developmental Studies Hybridoma Bank), anti-tenascin-C (GeneTex Inc., Irvine, CA, USA), anti-connexin 43 (Sigma-Aldrich), anti-collagen I (ab292, Abcam), anti-collagen IV (Vector Laboratories, Burlington, ON, Canada), anti-Ki67 (ab15580, Abcam), polyclonal anti-pan-laminin (Chemicon), and monoclonal anti-GFAP (ab4648, Abcam) antibodies. Actin filaments were stained using fluorochrome-coupled phalloidin (Life Technologies Corporation). Secondary antibodies were Alexa Fluor 488-conjugated goat anti-rabbit, Alexa Fluor 594-conjugated goat anti-mouse, Alexa Fluor 546-conjugated goat anti-mouse and Alexa Fluor 488-conjugated goat anti-mouse (Life Technologies Corporation).

For immunohistochemical analysis, monolayer and floating sphere cultures were fixed using phosphate buffered saline (PBS; pH 7.4) containing 4 % paraformaldehyde/5 % sucrose for 20 min. For detection of intracellular molecules,

cells were permeabilised using 0.5 % Triton X-100. To block background staining, cells were treated with PBS containing 3 % BSA/1 % glycine at room temperature for 30 min. Samples were then incubated with the primary antibody at 4 °C overnight or at room temperature for 2 h. For double immunostaining, primary antibodies were incubated as above. Samples were then incubated with the appropriate secondary antibodies at room temperature for 1 h. Cell nuclei were stained using DAPI (Life Technologies Corporation), followed by mounting of the samples using Immu-Mount solution (Thermo Scientific). To assess cell viability, cells were cultured in the presence of CellTrace Calcein Red-Orange AM (Life Technologies Corporation) as indicated by the supplier. Samples were observed and digital images recorded using Leica SP5X White Light Laser Confocal Microscope DMI 5000 (Leica Microsystems Inc., Concord, ON, Canada).

In a set of samples, cells were incubated with primary antibodies against Tau protein and neurofilament-M as above, followed by incubation with species-specific biotinylated secondary antibodies (Vectastain ABC kit; Vector Laboratories). Colour development was performed by using Vector VIP substrate (Vector Laboratories). Samples were counterstained using haematoxylin, mounted and observed with Nikon TS100 bright-field microscope (Nikon Canada, Mississauga, ON, Canada), and images captured using a Nikon Coolpix 995 digital camera (Nikon Canada). Control stainings were performed omitting the primary antibody, and gave negligible staining (data not shown).

For quantification of proportion of immunopositive cells in the cultures, at least five randomly selected microscopic fields using a $\times 20$ objective were counted by a single examiner. The results are presented as the total number of positive cells relative to total number of DAPI or haematoxylin stained cells in each sample.

Scanning electron microscopy

Floating spheres generated by the cells were collected using custom-made filter paper cones, fixed with 4 % paraformaldehyde/5 % sucrose solution in PIPES for 10 min, rinsed in PIPES and incubated in 2.5 % glutaraldehyde in PIPES for 5 min. After rinsing, spheres were incubated with 0.5 % osmium tetroxide for 60 min followed by dehydration in specific grade alcohol, critical point drying and attached on sample holders using silver paint (Canemco-Marivac, St. Laurent, QC, Canada). The samples were examined using Helios NanoLab 650 Dual Beam Scanning Electron Microscope (FEI, Hillsboro, OR, USA).

siRNA transfection

siRNA transfection was carried out using Lipofectamine RNAiMax (Life Technologies Corporation). To this end, 22 μ L of Lipofectamine RNAiMax and 150 pmol of connexin43 siRNA(UUUUGCAAGUGUAAACAGC[dT][dT] and AAUGAAAAGUACUGACAGC[dT][dT]) or control siRNA (ACUUCGACACAUCGACUGC[dT][dT]) was mixed with 2.4 mL of Opti-MEM medium (Life Technologies Corporation) and incubated at room temperature for 5 min. The mixtures of transfection reagent

and individual siRNA were combined and incubated for complex formation at room temperature for 20 min, diluted with Opti-MEM to final concentration of 30 nM, and added to the cells. After 5 h incubation in the cell culture incubator, the transfection medium was replaced with growth medium without antibiotics, and cells were cultured overnight before using for the experiments.

Statistical analysis

Statistical analysis was performed using Student's *t*-test, Wilcoxon test and one-way ANOVA (Kruskal-Wallis) with Bonferroni correction for multiple comparisons, and was carried out using Prism GraphPad 5 software (GraphPad Software Inc, La Jolla, CA, USA). Results are presented as mean \pm standard error of mean (SEM) from minimum of three biological replicates.

Results

Gingival fibroblasts derive from neural crest

In general, most of the oral and certain facial structures derive from the NC (Widera *et al.*, 2012). However, whether the cells originating from the NC are retained in older adult animals is not known. Therefore, to assess the presence of NC-derived cells in mature adult gingiva *in vivo*, we analysed 8-months-old Wnt1-CRE/R26RYFP mice. In these mice, cells that express NC-specific Wnt1 during embryogenesis are induced to express the fluorescent YFP. Subsequently, all daughter cells also express this marker throughout the life of the animal representing postmigratory NC-derived cells (Lemos *et al.*, 2012). Gingival tissue isolated from these mice showed typical gingival architecture with relatively thick keratinised epithelium and defined interdigitating epithelial/connective tissue interphase (Fig. 1a). Abdominal skin (derived from embryonic mesoderm), in contrast, showed typical mouse skin structure with thin keratinised epithelium and hair follicles (Fig. 1d). Gingival epithelium or endothelial cells of the blood vessels did not express YFP, but it was strongly expressed in most of the stromal cells in the connective tissue, including spindle-shaped fibroblast-like cells, and in cells around blood vessels (Fig. 1b and c). In the abdominal skin specimens, there was no YFP signal in any of the cells of the epidermis or the dermis as expected (Fig. 1e and f), except that some cells in hair follicles showed weak staining (not shown) as also previously described (Jinno *et al.*, 2010). Thus, NC-derived cells are also retained in gingival connective tissue of old animals.

To assess the putative NC origin of fibroblasts in human gingiva, we studied expression of a set of genes (Snail, Twist1, Pax3, Sox9, nestin and FOXD3) typically highly expressed by NC-derived cells (Crane and Trainor, 2006; Teng and Labosky, 2006), in cultured human gingival cells. To this end, we established GF cultures from tissue biopsies of healthy human attached gingiva from three different donors. From these cultures, we also generated cell subpopulations by CFU-F technique (termed GSC). Results from RT-PCR showed that all GF and GSC lines expressed Snail, Twist1, Sox9, nestin, FoxD3 and Pax3 (Fig. 1g and h). Assessment by qRT-PCR, showed that

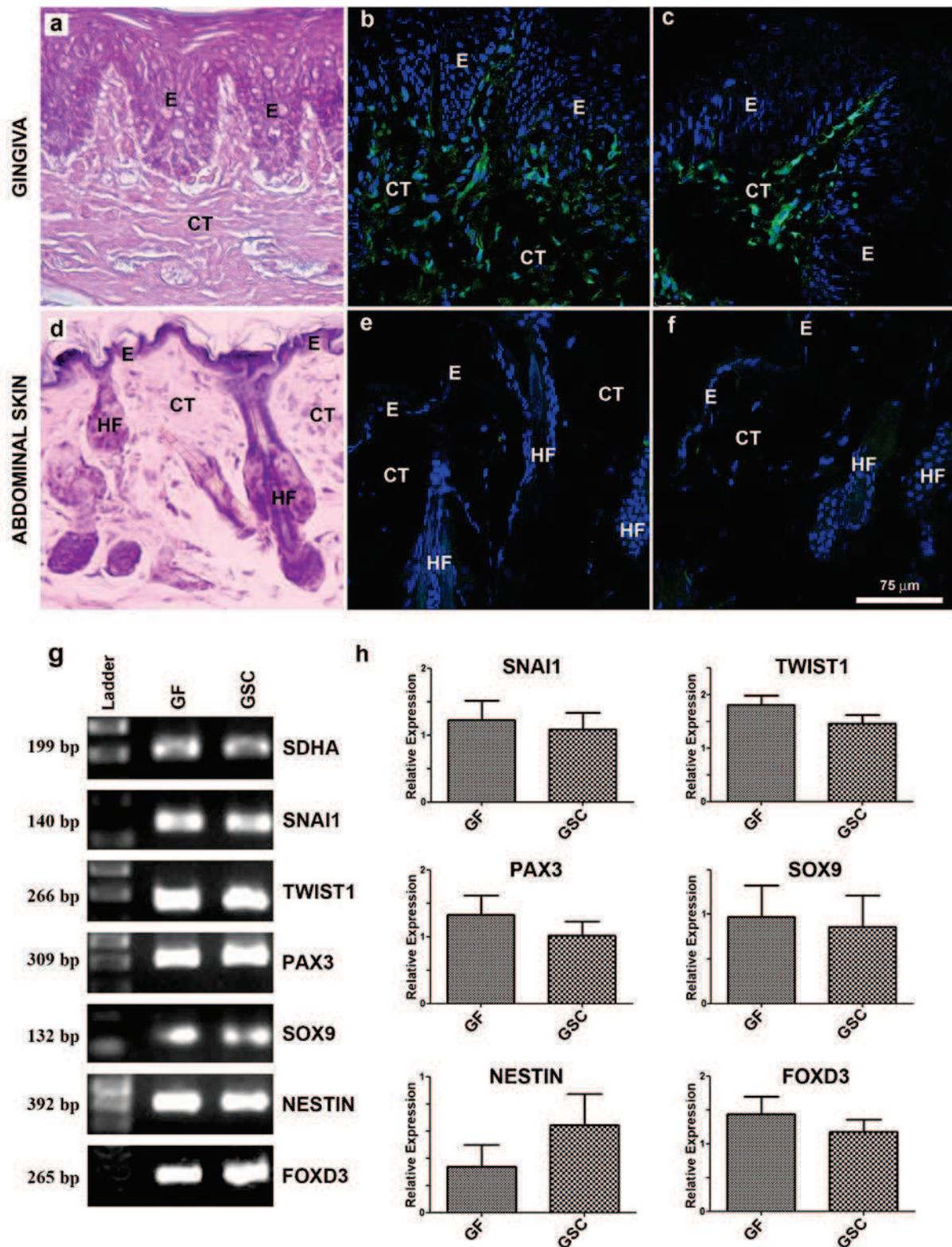


Fig. 1. Gingival cells derive from migratory neural crest cells and express neural crest-related genes. Representative tissue sections from 8-month-old Wnt1-CRE/R26RYFP transgenic mouse gingiva (**a-c**) and abdominal skin (**d-f**). Haematoxylin and eosin stained sections of gingiva (**a**) and abdominal skin (**d**). YFP-positive cells that derive from neural crest (NC) are abundantly present in gingival connective tissue (**b** and **c**), while no YFP-positive cells can be noted in the abdominal skin connective tissue (**e** and **f**). In gingiva, YFP-positive cells were enriched in connective tissue cells residing in the connective tissue papilla area between the epithelial rete ridges (**c**). E: epithelium; HF: hair follicle; CT: connective tissue. (**g**) Representative results from agarose gel electrophoresis analysis of expression of NC-related SNAI1, TWIST1, PAX3, SOX9, Nestin and Foxd3 mRNA determined by RT-PCR in human gingival fibroblast (GF) and gingival stem cell (GSC) cultures. Both cultures expressed all of the NC-related genes. SDHA was used as a reference gene. (**h**) Quantification of relative mRNA expression by qRT-PCR. No statistically significant differences were noted in the expression level of the NC-related genes in GF and GSC cultures.

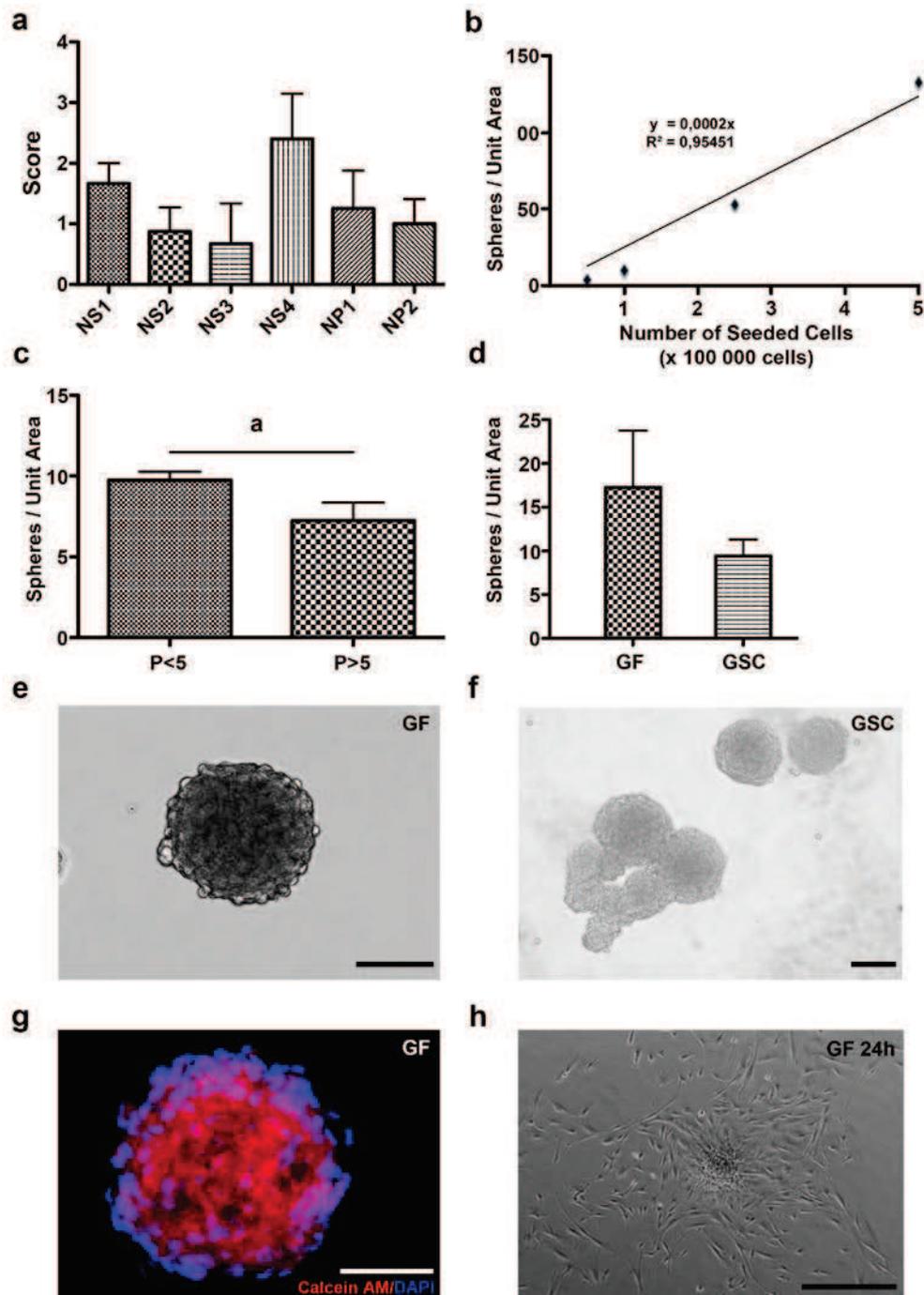


Fig. 2. Formation of neurospheres by cultured gingival cells. **(a)** Different culture media were assessed for their potential to promote neurosphere formation in cultured gingival fibroblasts (GFs) after 5 d. A score (0-4) was given based on the neurosphere-like morphology and number of neurospheres that were formed. NS4 medium was most conducive for sphere formation, although the differences did not reach statistical significance. **(b)** Increasing concentrations of GFs were cultured as neurospheres in NS4 medium as above and the number of neurospheres that formed *per* unit area was counted. The number of neurospheres increased proportionally to the number of cells seeded. **(c)** Increasing passage of GFs from $< P5$ to $> P5$ reduced neurosphere formation significantly ($a = p < 0.05$, Student's *t*-test). **(d)** When GFs and CFU-enriched gingival fibroblasts (GSC) were compared (initial seeding density of 250,000 cells) for their capacity to form neurospheres, no statistically significant differences were noted. **(e and f)** Phase-contrast images of neurospheres formed by GF **(e)** and GSC **(f)** cultures show similar sphere morphology in both cultures 5 d post-seeding. **(g and h)** Viability of GFs in the neurospheres formed 5 d post-seeding. NS4 medium was tested using Calcein AM dye assay **(g)**, and seeding the neurospheres on tissue culture-treated plastic in the classical medium (DMEM + 10 % FBS) **(h)**. **(g)** Calcein-AM treated GFs throughout the sphere showed bright red fluorescence indicating that they were alive. Nuclei were stained with DAPI (blue). **(h)** When the floating GF spheres were placed on tissue culture-treated culture dishes, they adhered to the substrate allowing the cells present in the spheres to migrate and proliferate on to the substrate to form a monolayer. The image shows outgrowth of the cells 24 h after initiation of the culture. Scale bars: 100 μ m **(e, f and g)**; 500 μ m **(h)**.

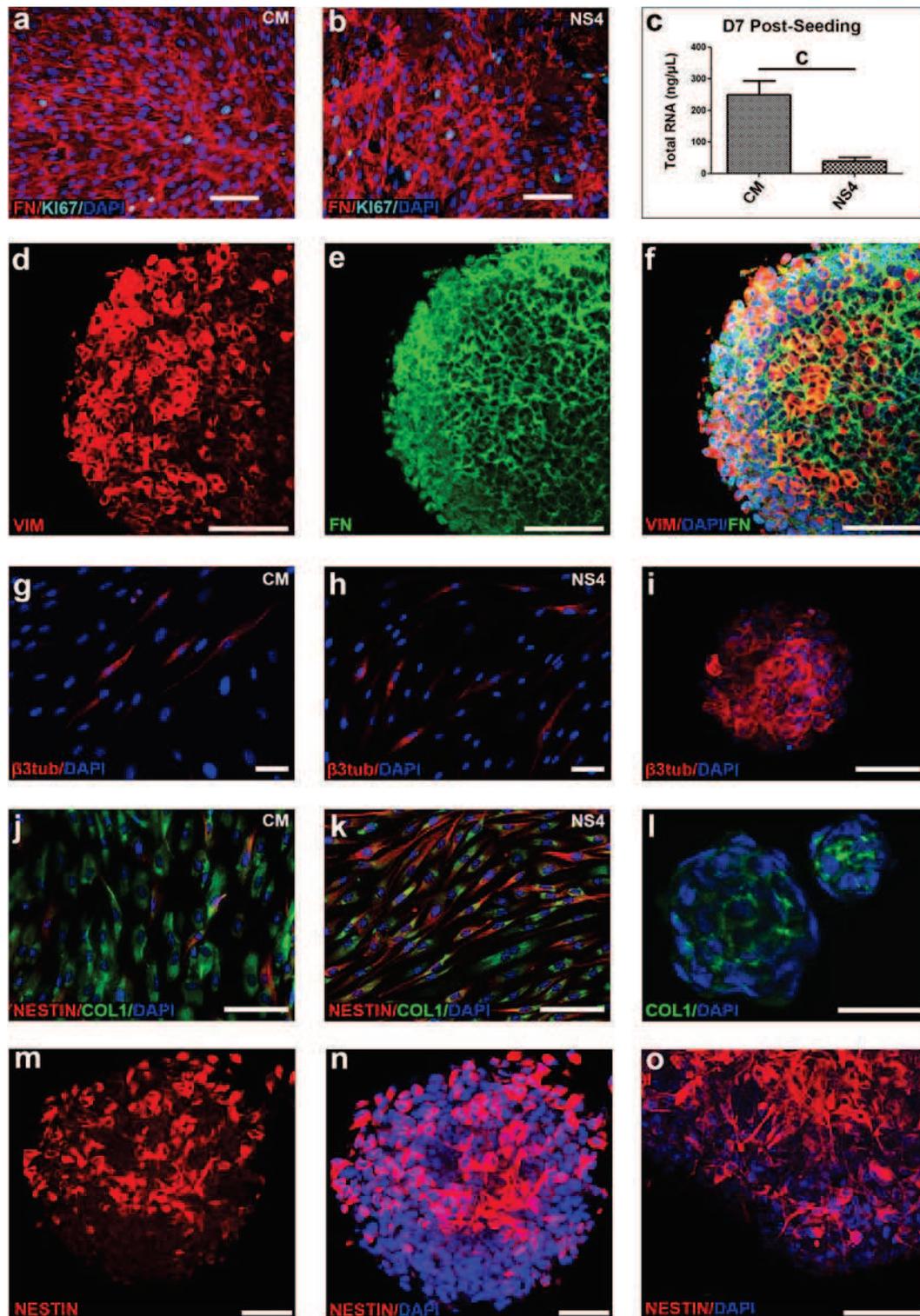


Fig. 3. Gingival fibroblasts undergo a neural phenotypic switch in NS4 medium and neurosphere culture. Figure shows analysis of cell proliferation and expression of mesenchymal/fibroblast markers fibronectin, vimentin and type I collagen, and neuronal markers β 3-tubulin and nestin in plastic-adherent monolayer and floating sphere cultures of gingival fibroblasts (GFs) generated in classical (CM; DMEM+10 % FBS) and NS4 medium after 5 d of induction. (a and b) Double immunostaining of fibronectin and Ki67 (a proliferation marker) in GF monolayer cultures generated in CM (a) and NS4 medium (b). (c) Comparison of GF growth by measurement of total RNA levels in plastic-adherent monolayer cultures in CM and NS4 medium 7 d post-seeding ($c = p < 0.001$, Bonferroni test). (d-f) Double immunostaining of vimentin and fibronectin in GFs cultured as floating spheres in NS4 medium. (g-i) Immunostaining of β 3-tubulin in GFs monolayer cultures in CM (g) or NS4 medium (h), or in floating sphere culture in NS4 medium (i). (j and k) Double immunostaining of nestin and type I collagen in GFs in monolayer culture in CM (j) and NS4 medium (k). (l) Immunostaining of type I collagen in GFs cultured as floating spheres in NS4 medium. (m-o) Immunolocalisation of nestin in floating sphere GF cultures in NS4 medium. Nuclei were stained with DAPI (blue). Scale bars: 100 μ m (a, b, d, e, f, j and k); 50 μ m (g, i, m, n and o); 25 μ m (l).

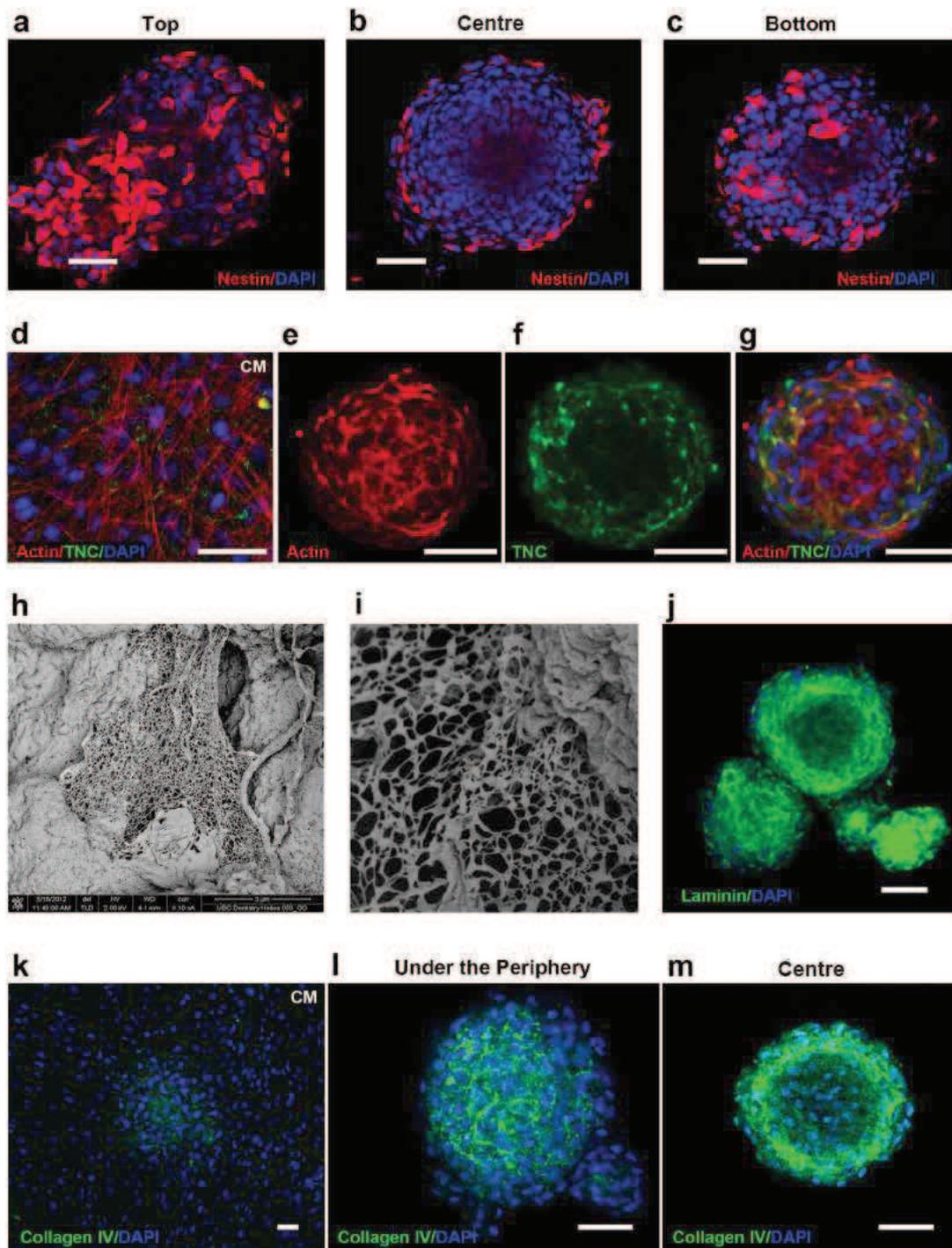


Fig. 4. Cells present on the outer surface layers of the neurospheres show distinct immunoreactivity for nestin and tenascin-C and are underlined by a basement membrane-like extracellular matrix. The figure shows characterisation of cell and extracellular matrix polarisation in GF-derived neurospheres generated in NS4 medium by immunostaining (a-g and j-m) and by scanning electron microscopy (SEM; h and i). (a-c) Representative confocal fluorescence microscope images of nestin localisation at the top, middle and bottom focal planes of a neurosphere. Cells showing most abundant nestin immunoreactivity are polarised to the outer surface of the neurosphere. (d-g) Representative images of double immunostaining of actin and tenascin-C (TNC) in a neurosphere (e-g), compared to GF monolayer cultured in CM (d). Cells showed well-organised actin cytoskeleton throughout the neurosphere. Immunoreactivity for tenascin-C was very weak in monolayer cultures (d), while in the floating sphere cultures it showed strong accumulation in the cells present in the several outer layers of the spheres (f and g). (h and i) Representative low (h) and high (i) power images of SEM analysis of a neurosphere showing a basement membrane-like network structure localised beneath the artificially fractured external cell layer. (j-m) The outer part of the neurospheres showed also abundant accumulation of laminin (j) and type IV collagen (l-m), while only weak positive staining for type IV collagen was noted in few areas of GF monolayer cultures in CM (k). Nuclear DAPI staining (blue) indicated that in the largest spheres the middle part contained fewer cells (a-c), while in the smallest ones, cells were more evenly distributed (l-m). The neurospheres were processed for immunostaining and SEM 5 d after cell seeding. Scale bars: 50 μ m.

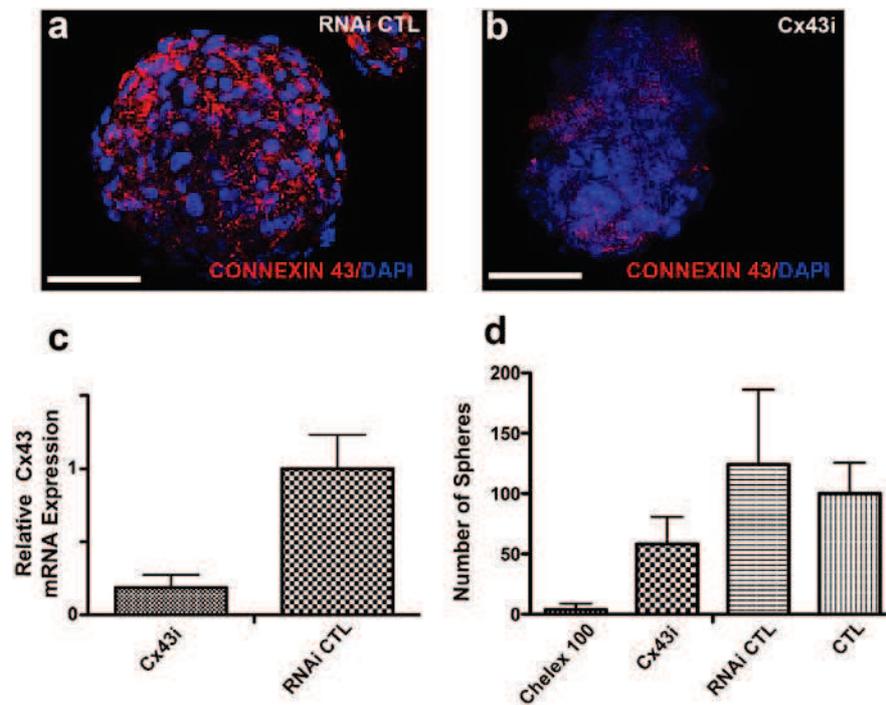


Fig. 5. Neurospheres express connexin 43 gap junction proteins that participate with calcium-dependent cell adhesions in the sphere formation. GFs were transfected with connexin 43 (Cx43) siRNA (CX43i) or control siRNA (RNAi CTL) before generation of floating spheres, and Cx43 abundance was assessed by immunostaining (**a** and **b**) and qRT-PCR (**c**). Immunostaining of Cx43 in neurospheres generated by cells treated with control siRNA showed abundant immunoreactivity of Cx43 throughout the sphere 5 days after seeding (**a**). Cx43 siRNA strongly reduced Cx43 immunoreactivity in the spheres (**b**). In general, spheres formed by cells transfected with Cx43 siRNA were smaller than those generated with control siRNA transfected cells (**a** and **b**). Nuclei were stained with DAPI (blue). (**c**) Quantification of Cx43 mRNA expression in Cx43 and control siRNA treated cells by qRT-PCR 24 h after transfection. Cx43 siRNA caused about 80 % down regulation of the target mRNA. (**d**) Quantification of neurospheres formed in the presence of Ca^{2+} chelator (Chelex[®] 100) that disrupts cadherin-mediated cell-cell adhesions, or treated with Cx43 (CX43i) or control (RNAi CTL) siRNA, or left untreated (CTL) at day 5 post-seeding. Inhibition of cadherin function by Ca^{2+} chelation completely inhibited neurosphere formation, while down regulation of Cx43 expression by siRNA reduced the number of neurospheres by about 50 %. Scale bars: 50 μm .

the above genes were expressed by GF and GSC cultures at similar level (Fig. 1h). Taken together, both human GF and GSC cultures established from gingiva express NC signature genes *in vitro*.

Gingival cells from monolayer cultures form floating neurospheres in suspension

NC-derived cells cultured from tissue by the explant culture or enzymatic release methods have a distinct ability to form floating spheres, also termed neurospheres, in culture (Achilleos and Trainor, 2012). However, this has never been tested with human gingiva-derived cells. Therefore, we further assessed whether GFs and GSCs form such spheres. We first tested the ability of six previously described culture media to support sphere formation. To this end, we released GFs from the monolayer cultures and seeded them in non-tissue culture treated dishes in the different test media (Table 1), and floating sphere formation was scored after 5 d. The results showed the highest sphere formation efficiency by NS4 medium (Fig. 2a), although this tendency was not statistically significant. Therefore, NS4 medium was chosen for the subsequent experiments. This medium has been previously used to

generate neurospheres using multipotent skin-derived precursors (SKP) that also derive from the NC (Davies *et al.*, 2010; Toma *et al.*, 2005). Using the NS4 medium, a linear correlation was found between the number of GFs seeded and relative number of spheres formed (Fig. 2b). On the other hand, sphere formation was dependent on cell passaging in culture, as it was significantly more efficient at low ($P < 5$) compared to high passage ($P > 5$) (Fig. 2c). When GFs and GSCs were compared, they showed no significant differences in their ability to form spheres (Fig. 2d). Morphologically, the floating spheres formed by all studied cell lines (Fig. 2e and f) resembled the classically described neurospheres generated by NC-derived cells enzymatically released from tissue (Toma *et al.*, 2001).

To confirm viability of the cells residing in the spheres we performed the Calcein AM viability assay. The results showed abundant fluorescent colour development in cells throughout the spheres, indicating that they were viable (Fig. 2g). To further confirm viability, the spheres were transferred to tissue culture-treated dishes, and incubated in the classical fibroblast culture medium (CM; DMEM containing 10 % FBS). In these conditions, both GF (Fig. 2h) and GSC (data not shown) spheres attached to the

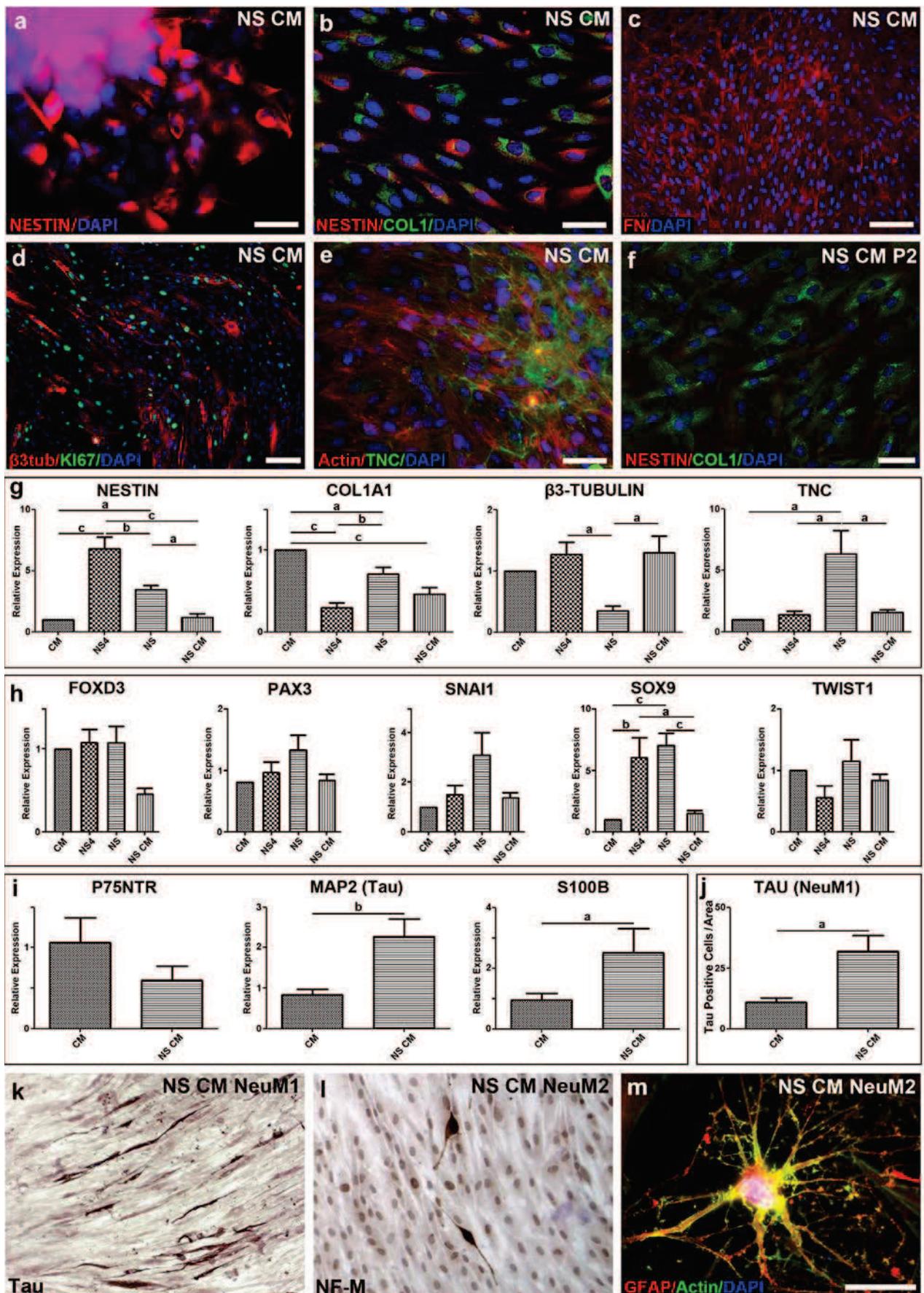


Fig. 6 (Legend on next page).

Fig. 6 (Previous page). Cells grown out of the gingival fibroblast-generated neurospheres express neural crest and neural markers. **(a-f)** Neurospheres generated by GFs in NS4 medium were placed on tissue culture-treated plates in the classical medium (CM; DMEM + 10 % FBS), and cells growing out of the spheres (NS CM) were analysed for expression of nestin **(a and b)**, type I collagen **(b)**, fibronectin **(c)**, β 3-tubulin **(d)**, Ki67 proliferation marker **(d)** and tenascin-C **(e)** by immunostaining 7 d after initiating the culture **(a-e)**. **(f)** Image shows nestin and type I collagen double immunostaining after propagation of outgrown cells as monolayer culture in CM medium for two passages. **(a-b)** Many cells migrating out of the spheres showed strong immunoreactivity for nestin. **(b)** Double immunostaining with the fibroblast marker type I collagen and nestin showed that during migration, some cells that produced type I collagen showed only weak nestin immunoreactivity, while most of the nestin positive cells did not show staining for type I collagen. **(c)** The extracellular matrix of outgrowing cells stained strongly for fibronectin. **(d)** Many of the cells growing out of the spheres showed strong immunostaining for β 3-tubulin and proliferation marker Ki67. However, many of the β 3-tubulin positive cells were negative for Ki67 staining. **(e)** Immunoreactivity for tenascin-C was noted in the area where the spheres were attached to the plastic dish, while cells migrating out from the sphere were mostly negative. **(f)** Immunostaining of cells outgrown from the spheres and cultured for two passages as a monolayer culture in CM (NS CM P2). Few cells showed only weak immunoreactivity for nestin while many were positive for type I collagen. **(g and h)** qRT-PCR analysis of nestin, type I collagen, β 3-tubulin, tenascin-C (TNC), SNAIL, TWIST1, PAX3, SOX9 and FOXD3 mRNA expression in parental GF monolayer cultures grown in CM or in NS4 media for 7 d, in floating neurospheres cultured in NS4 medium (NS) for 5 d, and in cells growing out of the neurospheres in CM (NS CM) after 7 d ($a = p < 0.05$; $b = p < 0.01$; $c = p < 0.001$; ANOVA, Bonferroni test). **(i)** qRT-PCR analysis of p75NTR, MAP2 and S100B in plastic adherent cells outgrown from the spheres and cultured in CM (NS CM) for 10 d compared to the parental GFs cultured in CM as monolayers (CM) ($a = p < 0.05$; $b = p < 0.01$; Wilcoxon test). **(j and k)** To induce neuronal differentiation, parental GF cultures (GF) and cells growing out of the neurospheres (NS CM) were cultured in CM supplemented with retinoic acid (NeuM1), and neuronal differentiation assessed by immunostaining of Tau after 10 d. All cultures contained cells that were positive for Tau staining, and the number of Tau positive cells was significantly higher in the NS CM compared to CM cultures **(j)** ($a = p < 0.05$; Wilcoxon test). **(l and m)** Cells growing out of the neurospheres were cultured in the neurogenic DMEM/F12 medium supplemented with 1 % N2 culture supplement and FGF2 (NeuM2), and expression of neurofilament-M **(l)** and Schwann cell marker GFAP **(m)** were assessed after three weeks by immunostaining. Scale bars: 50 μ m **(a, b, e, f and m)**; 100 μ m **(c and d)**.

culture dish followed by a rapid outgrowth of adherent cells, indicating that the spheres were composed of viable and functional cells. Thus, GFs and GSCs released from plastic-adherent monolayer cultures generate floating spheres that are composed of live cells that can be further propagated as plastic adherent cells.

Neurosphere formation involves neural phenotypic switch

To characterise the phenotype of GFs forming the floating spheres further, we compared cells maintained in CM and NS4 medium in plastic-adherent monolayer and floating sphere cultures. In monolayer cultures, both media supported cell growth as determined by the proliferation marker Ki67 immunostaining (Fig. 3a and b), although the increase in cell numbers, as indirectly determined by measuring total RNA content after 7 d, was significantly higher in CM than in NS4 medium (Fig. 3c). Immunolocalisation demonstrated that GFs in plastic-adherent monolayer cultures produced abundantly vimentin (data not shown) and fibronectin in both the CM (Fig. 3a) and NS4 medium (Fig. 3b). These two proteins are co-expressed in various connective tissue cells, including fibroblasts and MSCs (Fournier *et al.*, 2013). When GFs were cultured as floating spheres in NS4 medium, they maintained their immunoreactivity for vimentin and fibronectin similar to the monolayer cultures (Fig. 3d-f). Similar results were obtained with GSC cultures in corresponding monolayer or floating sphere cultures (data not shown).

We then assessed expression of two neural lineage-associated markers, cytoplasmic intermediate filaments β 3-tubulin and nestin, previously shown induced in neurosphere cultures (Toma *et al.*, 2005). When GFs were maintained in CM in monolayer cultures, only few cells were positive for β 3-tubulin (Fig. 3g) and nestin (Fig. 3j). However, switching cells into the NS4 medium in monolayer cultures caused a significant increase in nestin mRNA expression (Fig. 6l) and in the number of nestin positive cells in the cultures (Fig. 3k). This was associated with a significant reduction of mRNA expression (Fig. 6l) and immunoreactivity for type I collagen (Fig. 3j and k), a marker for fibroblast phenotype, in the cultures. In monolayer cultures in both CM and NS4 medium, individual cells were heterogeneous in nestin and type I collagen immunoreactivity as some showed staining for only nestin or collagen and some were positive for both (Fig. 3j and k). In contrast to nestin and type I collagen, switching from CM to NS4 medium did not have a marked effect in the number of β 3-tubulin positive cells (Fig. 3g and h), or β 3-tubulin mRNA expression (Fig. 6l). However, when the cells were cultured in NS4 medium as floating spheres, most spheres showed abundant immunoreactivity for β 3-tubulin (Fig. 3l) and nestin (Fig. 3m-o). While the floating spheres showed some cells positive for type I collagen immunostaining (Fig. 3l), similar to monolayer cultures in NS4 medium, expression of collagen mRNA in floating spheres remained significantly lower as compared with the monolayer cultures in CM (Fig. 6l).

Taken together, in gingival cells, expression of fibronectin and vimentin, two proteins produced by fibroblasts and MSCs, and neural-related β 3-tubulin is independent of the culture medium, and is retained in the floating sphere cultures. However, switching from the CM to NS4 medium in monolayer cultures induces expression of nestin, while suppressing expression of the fibroblast-specific type I collagen. This NS4 medium-induced phenotypic switch is maintained when cells are propagated in the floating sphere cultures.

Neurosphere formation involves cell and extracellular matrix polarisation in the spheres

Next, we performed a more detailed analysis of organisation and polarisation of key neurosphere molecules in the floating spheres by using confocal fluorescence microscopy (Fig. 4). Examination of distribution of DAPI-stained nuclei by using optical sections from top, centre and bottom planes of the spheres was used to assess cell distribution within the spheres. In the largest spheres the middle part contained fewer cells (Fig. 4a-c), while in the smallest ones, cells were rather evenly distributed (Fig. 4l and m). Visualisation of actin distribution also demonstrated presence of cells with well-organised filamentous actin cytoskeleton throughout the smaller spheres (Fig. 4e and g). Interestingly, the nestin positive cells were concentrated on the outer surface of the GF (Fig. 4a-c) and GSC (data not shown) spheres. Tenascin-C (Fig. 4f and g), a molecule involved in NC migration (Tucker, 2001), and basement membrane components laminins (Fig. 4j) and type IV collagen (Fig. 4l-m) were most strongly localised in the surface layers of the spheres. In contrast, tenascin-C (Fig. 4d) and type IV collagen (Fig. 4k) were practically absent from monolayer cultures in CM. The above molecules, and fibronectin that also accumulated strongly in the spheres (Fig. 1, 3e and f), are abundantly present in embryonic NC extracellular matrix (ECM) (Hall, 1999). Morphological characterisation of the spheres by scanning electron microscopy demonstrated a net-like ECM structure underneath the surface cell layers (Fig. 4h and i).

Taken together, culture of GFs and GSCs in floating spheres in NS4 medium causes polarisation of the nestin-positive cells to the outer surface of the spheres. This is associated with accumulation of an ECM underneath the polarised nestin-positive cell layer that has molecular composition and organisation that resembles basement membrane, and contains fibronectin and tenascin-C, reminiscent of ECM involved in embryonic NC migration (Hall, 1999). Thus, floating sphere cultures induced an organotypic cellular and molecular polarisation distinct from monolayer cultures.

Neurosphere formation is regulated by connexin 43 and calcium-dependent cell-cell communication

In classical neurosphere cultures formed by neural progenitors, cells form abundant connexin 43 (Cx43)-mediated gap junctions that may aid their intercellular communication and sphere formation (Duval *et al.*, 2002). Therefore, we wanted to explore cell-cell contacts in the floating spheres from GFs. We have shown previously that GFs form Cx43-mediated gap-junctions in monolayer

cultures (Tarzeman *et al.*, 2015). Accordingly, GFs cultured in the floating spheres showed abundant punctate Cx43 staining (Fig. 5a) typical to Cx43 gap-junction plaques (Tarzeman *et al.*, 2015). In order to find out whether Cx43 was important for the sphere formation, we suppressed its expression by siRNA, which resulted to about 80 % down regulation of Cx43 mRNA expression (Fig. 5c), and to a strong reduction in Cx43 immunoreactivity in the spheres (Fig. 5b). Cx43 down regulation caused a 60 % decrease in the number of spheres formed after 5 d (Fig. 5d), reduced their size and resulted to a less well-defined sphere organisation and morphology (Fig. 5a and b). In addition to connexins, cadherins, Ca^{2+} -dependent cell-cell adhesion molecules, are crucial for NC cells (Taneyhill and Schifffmacher, 2013). Therefore, we inhibited cadherin-mediated cell-cell contacts by reducing culture medium Ca^{2+} concentration by a Ca^{2+} chelator (Chelex® 100) during sphere formation. Chelation of Ca^{2+} completely inhibited sphere formation (Fig. 5d). Thus, cell-cell communication mediated by Cx43 and Ca^{2+} -dependant cell-cell junctions, likely representing cadherins, are critical for gingival cell floating sphere formation.

Neural crest/neural gene expression and differentiation of floating sphere-derived cells

In order to assess if the cells within the floating spheres possessed differentiation capacity as described for SKP neurospheres (Toma *et al.*, 2001), we transferred them to tissue culture-treated dishes and cultured them in CM (DMEM + 10 % FBS). Within a few hours, the spheres attached to the dishes and cells began to migrate out (Fig. 6a), as has been described for neural progenitor neurospheres (Jacques *et al.*, 1998). The first migrating cells were strongly positive for nestin immunostaining (Fig. 6a and b). In addition, cells positive for type I collagen, fibronectin and β 3-tubulin were detected in the cultures (Fig. 6b-d). Interestingly, the type I collagen positive cells appeared to be mostly negative for nestin, while cells strongly positive for nestin did not stain for type I collagen (Fig. 6b). Many of the migrating cells also showed positive nuclear staining for the proliferation marker Ki67 (Fig. 6d). However, double immunostaining suggested that most of the β 3-tubulin positive cells present in the outgrowths were not proliferating (Fig. 6d). Tenascin C, which was strongly expressed in the outer layer of the spheres, was detected at the point where the sphere attached to the plastic dish, but was mostly absent from the cells migrating out of the sphere (Fig. 6e). Thus, cells outgrowing from the spheres produced nestin (Fig. 6a and b) and β 3 tubulin (Fig. 6d), while their parental cultures not subjected to floating sphere formation were mostly negative for these molecules in the same condition (monolayer culture in CM) (Fig. 3g). Further propagation and passaging of the outgrown cells as monolayer cultures in CM showed, however, that the highly nestin (Fig. 6f) and β 3-tubulin (data not shown) positive cell populations were lost once the cells had been passaged twice, while an increase in the number of cells positive for type I collagen was observed (Fig. 6f).

To compare the effect of culture conditions on cell phenotype in more detail, we performed qRT-PCR to assess expression of NC and neuronal genes in the parental

monolayer GFs cultured in CM or in NS4 for 7 d, in floating spheres in NS4 medium for 5 d (NS), or 7 d after spheres were reseeded to grow as plastic adherent cells in CM (NS CM). Results showed that floating spheres grown in NS4 medium (NS) expressed significantly greater levels of nestin, tenascin-C and SOX9 as compared to CM and NS CM cultures (Fig. 6g and h), while there were no significant differences in the levels of FOXD3, PAX3, SNAIL and TWIST1 expression (Fig. 6h). When cells cultured in NS4 medium as monolayer or neurosphere cultures were compared, the sphere culture induced an upregulation of NC-associated tenascin-C and down regulation of nestin and β 3 tubulin (Fig. 6g). In contrast to the above NC and neuronal signature genes, the mesenchymal/fibroblast marker type 1 collagen was strongly down regulated in NS4, NS and NS CM cultures as compared to CM cultures (Fig. 6g). Thus, the findings show that monolayer and floating sphere culture of NC-like GFs and GSCs in NS4 medium induces and/or enriches cells with NC-like phenotype. Together with the above data showing striking spatial polarisation of several proteins, including tenascin-C and nestin, within the neurospheres (Fig. 4), the gene expression changes occurring in neurosphere cultures suggest that the floating sphere culture distinctly further modulates phenotype of GF subpopulations within the spheres.

In order to further assess their neural characteristics, parental monolayer GF cultures and cells grown out of the spheres (NS CM) were treated with trans-retinoic acid in CM (NeuM1) (Gong *et al.*, 2013), and expression of neuronal marker Tau was assessed by immunostaining (Fig. 6k). After 10 d, cultures contained cells that had a narrow elongated morphology and showed positive staining for Tau, but the number of positive cells in NS CM cultures was significantly greater than in CM cultures (Fig. 6j). To further assess the phenotype of NS CM cells, we cultured them in the presence of another neurogenic medium (DMEM/F12 supplemented with 1 % N2 culture supplement and FGF2; NeuM2) and assessed the expression of neurofilament-M (another neuronal marker) and GFAP (a glial/Schwann cell marker) by immunostaining (Fig. 6l and m). After three weeks, elongated neurofilament-M positive cells had appeared on top of the underlying negative cells (Fig. 6l). In addition, scattered cells with a distinct stellate morphology were positive for GFAP (Fig. 6m). This is similar to what has been described for SKP cultures that have undergone neural differentiation (Toma *et al.*, 2005). Thus, gingival cells outgrown from the floating spheres (NS CM) maintained their distinct phenotype transiently, and under neural-differentiation conditions generated cells with neural morphologies, and showed positive immunostaining for neural markers Tau, neurofilament-M and GFAP.

To further assess neural differentiation, we performed qRT-PCR of neuronal (MAP2) and Schwann cell (S100B and p75NTR) marker genes in the parental monolayer cultures in CM, and in sphere-derived cells that were reseeded to grow as plastic adherent cells in CM (NS CM) for 10 d (Fig. 6i). Results showed that cells derived from spheres (NS CM) expressed significantly greater levels of MAP2 and S100B as compared to the CM cultures (Fig.

6i). Thus, propagation of cells in the floating neurospheres promoted their neural differentiation potential.

Discussion

Use of NC-derived cells has been hampered due to their rarity in adult tissues, and their complex isolation process. Furthermore, the abundance of these cells in tissues decreases during aging (Hunt *et al.*, 2009). Previous studies have suggested that gingival tissue derives from the NC and harbours abundantly cells with NC-like properties (Marynka-Kalmani *et al.*, 2010; Widera *et al.*, 2009; Xu *et al.*, 2013). Particularly, findings from juvenile (8-weeks-old) NC-reporter mice showed that NC-derived cells were present in the gingival connective tissue, and represented the majority of cells within CFU-F colonies generated by the cells cultured from the tissue (Xu *et al.*, 2013). Our findings from 8-months-old Wnt1-Cre/R26RYFP NC-reporter mice demonstrated that gingival connective tissue still contained abundantly NC-derived cells also in these much older animals. Therefore, aging may not have a dramatic effect on the abundance of these cells in gingiva. In support of this, a recent study reported that the expression of pluripotency-associated genes and multipotent differentiation capacity is similar in gingival cells isolated from young and old human donors (Marynka-Kalmani *et al.*, 2010).

Isolation and enrichment of neural progenitors and NC-derived cells has been classically performed with cells enzymatically released directly from the tissue, and then culturing them in suspension in a serum-free medium supplemented with mitogens where cells aggregate to form floating spheres (also called neurospheres) (Gil-Perotin *et al.*, 2013; Pastrana *et al.*, 2011). This protocol may selectively enrich a distinct cell population from the tissue or allow the cells to maintain or acquire a distinct phenotype that might be lost during the standard culture of plastic-adherent cells in serum containing medium (Pastrana *et al.*, 2011). The challenge with this protocol is to release adequate numbers of the rare NC-derived cells from the tissues. One approach to eliminate this problem is to first expand the cells in culture before subjecting them to the neurosphere generation. Therefore, we tested whether the gingival cells maintained in the standard serum-containing medium as plastic-adherent cultures express NC-related genes, and whether they generate floating neurospheres and possess neural differentiation potential, key characteristics described for NC-derived stem cells (Calderone, 2012; Toma *et al.*, 2001). For the experiments, we used both parental fibroblast cultures (GFs) and pooled CFU-F populations (GSC) from these cultures. Pooled CFU-F populations of human gingival cells contain progenitor cells with multipotent differentiation potential (Fournier *et al.*, 2013), although these properties can also be found in non-selected human gingival fibroblast cultures (Häkkinen *et al.*, 2014; Marynka-Kalmani *et al.*, 2010). Accordingly, our findings showed that both GF and GSC cultures expressed nestin, a cytoskeletal molecule present in neural progenitor/stem cells (Calderone, 2012), and Snail, Twist1,

Pax3, Sox9 and FoxD3, transcription factors typical to NC-progenitors (Kaltschmidt *et al.*, 2012). A distinct feature of NC-related cells is that they form floating spheres in the presence of EGF and FGF2 (Calderone, 2012; Dupin and Coelho-Aguiar, 2013). The findings showed that GFs and GSCs released from plastic-adherent cultures generated these spheres in the serum-free medium containing the above factors. Gingival neurosphere formation depended on expression and function of Cx43, a molecule also found in early migratory NC cells and NC-derived progenitor cells where it regulates their neurosphere formation ability (Curchoe *et al.*, 2010; Duval *et al.*, 2002; Pelaez *et al.*, 2013). Furthermore, gingival neurosphere formation was totally calcium-dependent suggesting involvement of cadherins that require calcium for proper function. Cadherins regulate NC development and neurosphere formation by neural progenitors, and can be used as a target to selectively isolate these cells (Taneyhill, 2008; Yagita *et al.*, 2009; Zhou and Snead, 2008). Thus, our findings indicate that the human gingival cell populations are enriched with NC-like cells capable of neurosphere formation *in vitro*.

Interestingly, cells in the neurospheres showed significantly increased expression of NC and neural progenitor-related genes, including nestin, tenascin-C and Sox9, while they displayed down regulation of fibroblast-related type I collagen, when compared to standard monolayer cultures. Thus, cellular niche in the neurospheres further promoted the NC-like phenotype of the cells. Alternatively, the sphere formation selected cells with NC-properties, while suppressing the mesenchymal phenotype (type I collagen expressing) out of the heterogeneous parental populations. Interestingly, the phenotypic switch characterised by elevated expression of nestin and SOX9 and down regulation of type I collagen, was also achieved by incubating the monolayer cultures in the NS4 medium, suggesting that gingival cells can acquire an enhanced NC-like phenotype in plastic adherent cultures when appropriately stimulated without the need for the neurosphere culture step.

In order to assess in more detail the phenotype of neurosphere-associated cells, we analysed them structurally. Remarkably, in the gingival cell-derived neurospheres, the nestin positive cells were polarised to the outer layers and were surrounded and underlined with an ECM that was rich in molecules typical to embryonic NC and believed to support NC migration (Hall, 1999), namely fibronectin, laminin, type IV collagen and tenascin-C. Thus, gingival cells placed in neurosphere cultures generate an autogenous ECM niche that recapitulates some of the features found in the embryonic tissue. This niche maybe critical to maintain the NC-like phenotype of the gingival neurosphere-associated cells as propagation and serial passaging of neurosphere-derived cells in their standard medium in a monolayer culture resulted to a loss of their phenotype. In any case, initially, when placed in plastic adherent cultures, the neurosphere-derived cells generated a plastic adherent, proliferating population that contained two distinct populations of cells. These were composed of cells that were either positive for nestin or type I collagen immunoreactivity, respectively, suggesting that the cell

population contained distinct NC-like cells (nestin +) and fibroblastic (type I collagen +) cells. These neurosphere-derived cells showed an increased expression of neuronal MAP2 and of the Schwann cell-related S100B markers, and when they were further cultured in distinct neurogenic differentiation media, they generated Tau, neurofilament-M and GFAP positive cells, suggesting neural differentiation potential (Svendsen *et al.*, 2001). The frequency of Tau-positive cells in the neurosphere-derived cultures was significantly higher than in the standard cultures implying that neurosphere generation protocol enhanced neuronal differentiation potential of the gingival cells.

There is ample experimental evidence that skin contains so-called skin-derived precursors (SKPs) (Hunt *et al.*, 2009). SKPs can be generated from enzymatically released cells by subjecting them directly upon release to a floating sphere culture in medium containing EGF and FGF2 (Fernandes *et al.*, 2004). Recently, cells with similar properties were also isolated from established skin cell cultures (Hill *et al.*, 2012). SKPs compose a small subpopulation of cells most commonly found in NC-derived skin compartments, such as facial hair follicles and express NC-related genes, including nestin, Snai1, Twist, Pax3 and Sox9. Furthermore, when cells grown out from the floating SKP spheres were stimulated appropriately they underwent neural and mesenchymal multi-lineage differentiation (Fernandes *et al.*, 2004; Fernandes *et al.*, 2008; Hunt *et al.*, 2009; Toma *et al.*, 2001). Thus, human gingival cells from standard plastic adherent cultures and SKPs from skin may share similar NC phenotype and neural differentiation potential. Therefore, our findings suggest that standard non-selected and CFU-F-selected human gingival progenitor cell cultures contain NC-like cells with distinct NC-like differentiation potential, and may provide an easy source of these cells *via* enrichment by floating sphere cultures for various applications. For instance, gingiva is a particularly attractive source for cell therapy, as the tissue is easily accessible without the need for tooth extraction, and tissue discards are common during routine dental procedures. In addition, unlike in skin, wound healing in gingiva is fast and does not result in scar formation, and donors experience very little morbidity (Fournier *et al.*, 2013; Häkkinen *et al.*, 2014). In addition to the therapeutic applications, gingival cells may provide a novel tool to study mechanisms of NC-like differentiation and diseases affecting NC derivatives.

Acknowledgements

Supported by Canadian Institutes of Health Research (CIHR), Agence Nationale de la Recherche (ANR) grant SVSE 1-2012 “osteodiversity” and “gueules cassées” foundation. We thank Dr. Fabio Rossi (University of British Columbia, Vancouver, BC, Canada) for providing the transgenic mice for the study. We thank the “Cytometry and Cell Image Center” of the Cordelier Research Center and especially C. Klein for his technical expertise. The antibodies HFN 7.1, E7 and RT97 developed by Klebe RJ, Klymkowsky M and Wood J, respectively, were obtained from the Developmental Studies Hybridoma

Bank, created by the NICHD of the NIH and maintained at The University of Iowa, Department of Biology, Iowa City, IA 52242, USA.

References

- Abe S, Hamada K, Miura M, Yamaguchi S (2012) Neural crest stem cell property of apical pulp cells derived from human developing tooth. *Cell Biol Int* **36**: 927-936.
- Achilleos A, Trainor PA (2012) Neural crest stem cells: discovery, properties and potential for therapy. *Cell Res* **22**: 288-304.
- Arthur A, Rychkov G, Shi S, Koblar SA, Gronthos S (2008) Adult human dental pulp stem cells differentiate toward functionally active neurons under appropriate environmental cues. *Stem Cells* **26**: 1787-1795.
- Barbu M, Ziller C, Rong PM, Le Douarin NM (1986) Heterogeneity in migrating neural crest cells revealed by a monoclonal antibody. *J Neurosci* **6**: 2215-2225.
- Calderone A (2012) Nestin+ cells and healing the infarcted heart. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **302**: H1-9.
- Chai Y, Jiang X, Ito Y, Bringas P Jr, Han J, Rowitch DH, Soriano P, McMahon AP, Sucov HM (2000) Fate of the mammalian cranial neural crest during tooth and mandibular morphogenesis. *Development* **127**: 1671-1679.
- Crane JF, Trainor PA (2006) Neural crest stem and progenitor cells. *Annu Rev Cell Dev Biol* **22**: 267-286.
- Curchoe CL, Maurer J, McKeown SJ, Cattarossi G, Cimadamore F, Nilbratt M, Snyder EY, Bronner-Fraser M, Terskikh AV (2010) Early acquisition of neural crest competence during hESCs neuralization. *PLoS One* **5**: e13890.
- Davies LC, Locke M, Webb RD, Roberts JT, Langley M, Thomas DW, Archer CW, Stephens P (2010) A multipotent neural crest-derived progenitor cell population is resident within the oral mucosa lamina propria. *Stem Cells Dev* **19**: 819-830.
- Dong R, Liu X, Fan M, Yang L, Peng L, Zhang L (2010) Isolation and differentiation of nestin positive cells from rat oral mucosal lamina propria. *Differentiation* **79**: 9-14.
- Dupin E, Calloni G, Real C, Goncalves-Trentin A, Le Douarin NM (2007) Neural crest progenitors and stem cells. *C R Biol* **330**: 521-529.
- Dupin E, Coelho-Aguiar JM (2013) Isolation and differentiation properties of neural crest stem cells. *Cytometry A* **83**: 38-47.
- Dupin E, Sommer L (2012) Neural crest progenitors and stem cells: from early development to adulthood. *Dev Biol* **366**: 83-95.
- Durand E, Fournier B, Couty L, Lemitre M, Achouh P, Julia P, Trinquart L, Fabiani JN, Segulier S, Gogly B, Coulomb B, Lafont A (2012) Endoluminal gingival fibroblast transfer reduces the size of rabbit carotid aneurisms *via* elastin repair. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **32**: 1892-1901.
- Duval N, Gomes D, Calaora V, Calabrese A, Meda P, Bruzzone R (2002) Cell coupling and Cx43 expression in embryonic mouse neural progenitor cells. *J Cell Sci* **115**: 3241-3251.
- Fernandes KJ, McKenzie IA, Mill P, Smith KM, Akhavan M, Barnabe-Heider F, Biernaskie J, Junek A, Kobayashi NR, Toma JG, Kaplan DR, Labosky PA, Rafuse V, Hui CC, Miller FD (2004) A dermal niche for multipotent adult skin-derived precursor cells. *Nat Cell Biol* **6**: 1082-1093.
- Fernandes KJ, Toma JG, Miller FD (2008) Multipotent skin-derived precursors: adult neural crest-related precursors with therapeutic potential. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **363**: 185-198.
- Fournier BP, Ferre FC, Couty L, Lataillade JJ, Gourven M, Naveau A, Coulomb B, Lafont A, Gogly B (2010) Multipotent progenitor cells in gingival connective tissue. *Tissue Eng Part A* **16**: 2891-2899.
- Fournier BP, Larjava H, Häkkinen L (2013) Gingiva as a source of stem cells with therapeutic potential. *Stem Cells Dev* **22**: 3157-3177.
- Gago N, Perez-Lopez V, Sanz-Jaka JP, Cormenzana P, Eizaguirre I, Bernad A, Izeta A (2009) Age-dependent depletion of human skin-derived progenitor cells. *Stem Cells* **27**: 1164-1172.
- Gammill LS, Bronner-Fraser M (2003) Neural crest specification: migrating into genomics. *Nat Rev Neurosci* **4**: 795-805.
- Ganz J, Arie I, Buch S, Zur TB, Barhum Y, Pour S, Araidy S, Pitaru S, Offen D (2014) Dopaminergic-like neurons derived from oral mucosa stem cells by developmental cues improve symptoms in the hemiparkinsonian rat model. *PLoS One* **9**: e100445.
- Gil-Perotin S, Duran-Moreno M, Cebrian-Silla A, Ramirez M, Garcia-Belda P, Garcia-Verdugo JM (2013) Adult neural stem cells from the subventricular zone: a review of the neurosphere assay. *Anat Rec (Hoboken)* **296**: 1435-1452.
- Glim JE, van Egmond M, Niessen FB, Everts V, Beelen RH (2013) Detrimental dermal wound healing: what can we learn from the oral mucosa? *Wound Repair Regen* **21**: 648-660.
- Gong M, Bi Y, Jiang W, Zhang Y, Chen L, Hou N, Chen J, Li T (2013) Retinoic acid receptor beta mediates all-trans retinoic acid facilitation of mesenchymal stem cells neuronal differentiation. *Int J Biochem Cell Biol* **45**: 866-875.
- Häkkinen L, Larjava H, Fournier BP (2014) Distinct phenotype and therapeutic potential of gingival fibroblasts. *Cytotherapy* **16**: 1171-1186.
- Hall BK (1999) *The neural crest in development and evolution*. Springer-Verlag New York Inc.
- Hill RP, Gledhill K, Gardner A, Higgins CA, Crawford H, Lawrence C, Hutchison CJ, Owens WA, Kara B, James SE, Jahoda CA (2012) Generation and characterization of multipotent stem cells from established dermal cultures. *PLoS One* **7**: e50742.
- Hunt DP, Jahoda C, Chandran S (2009) Multipotent skin-derived precursors: from biology to clinical translation. *Curr Opin Biotechnol* **20**: 522-530.
- Ibarretxe G, Crende O, Aurrekoetxea M, Garcia-Murga V, Etxaniz J, Unda F (2012) Neural crest stem cells from dental tissues: a new hope for dental and neural regeneration. *Stem Cells Int* **2012**: 103503.

- Jacques TS, Relvas JB, Nishimura S, Pytela R, Edwards GM, Streuli CH, French-Constant C (1998) Neural precursor cell chain migration and division are regulated through different beta 1 integrins. *Development* **125**: 3167-3177.
- Jinno H, Morozova O, Jones KL, Biernaskie JA, Paris M, Hosokawa R, Rudnicki MA, Chai Y, Rossi F, Marra MA, Miller FD (2010) Convergent genesis of an adult neural crest-like dermal stem cell from distinct developmental origins. *Stem Cells* **28**: 2027-2040.
- Jung S, Sen A, Rosenberg L, Behie LA (2010) Identification of growth and attachment factors for the serum-free isolation and expansion of human mesenchymal stromal cells. *Cytotherapy* **12**: 637-657.
- Kaltschmidt B, Kaltschmidt C, Widera D (2012) Adult craniofacial stem cells: sources and relation to the neural crest. *Stem Cell Rev* **8**: 658-671.
- Kawanabe N, Murata S, Murakami K, Ishihara Y, Hayano S, Kurosaka H, Kamioka H, Takano-Yamamoto T, Yamashiro T (2010) Isolation of multipotent stem cells in human periodontal ligament using stage-specific embryonic antigen-4. *Differentiation* **79**: 74-83.
- Kobayashi K, Suzuki T, Nomoto Y, Tada Y, Miyake M, Hazama A, Nakamura T, Omori K (2007) Potential of heterotopic fibroblasts as autologous transplanted cells for tracheal epithelial regeneration. *Tissue Eng* **13**: 2175-2184.
- Kuznetsov SA, Friedenstein AJ, Robey PG (1997) Factors required for bone marrow stromal fibroblast colony formation *in vitro*. *Br J Haematol* **97**: 561-570.
- La Noce M, Mele L, Tirino V, Paino F, De Rosa A, Naddeo P, Papagerakis P, Papaccio G, Desiderio V (2014) Neural crest stem cell population in craniomaxillofacial development and tissue repair. *Eur Cell Mater* **28**: 348-357.
- Le Douarin NM (2012) Piecing together the vertebrate skull. *Development* **139**: 4293-4296.
- Le Douarin NM, Calloni GW, Dupin E (2008) The stem cells of the neural crest. *Cell Cycle* **7**: 1013-1019.
- Le Lièvre CS and Le Douarin NM (1975) Mesenchymal derivatives of the neural crest: analysis of chimaeric quail and chick embryos. *J Embryol Exp Morphol* **34**: 125-154.
- Lemos DR, Paylor B, Chang C, Sampaio A, Underhill TM, Rossi FM (2012) Functionally convergent white adipogenic progenitors of different lineages participate in a diffused system supporting tissue regeneration. *Stem Cells* **30**: 1152-1162.
- Marynka-Kalmani K, Treves S, Yafee M, Rachima H, Gafni Y, Cohen MA, Pitaru S (2010) The lamina propria of adult human oral mucosa harbors a novel stem cell population. *Stem Cells* **28**: 984-995.
- Nagoshi N, Shibata S, Kubota Y, Nakamura M, Nagai Y, Satoh E, Morikawa S, Okada Y, Mabuchi Y, Katoh H, Okada S, Fukuda K, Suda T, Matsuzaki Y, Toyama Y, Okano H (2008) Ontogeny and multipotency of neural crest-derived stem cells in mouse bone marrow, dorsal root ganglia, and whisker pad. *Cell Stem Cell* **2**: 392-403.
- Pastrana E, Silva-Vargas V, Doetsch F (2011) Eyes wide open: a critical review of sphere-formation as an assay for stem cells. *Cell Stem Cell* **8**: 486-498.
- Pelaez D, Huang CY, Cheung HS (2013) Isolation of pluripotent neural crest-derived stem cells from adult human tissues by connexin-43 enrichment. *Stem Cells Dev* **22**: 2906-2914.
- Price FM, Taylor WG, Camalier RF, Sanford KK (1983) Approaches to enhance proliferation of human epidermal keratinocytes in mass culture. *J Natl Cancer Inst* **70**: 853-861.
- Sieber-Blum M, Grim M, Hu YF, Szeder V (2004) Pluripotent neural crest stem cells in the adult hair follicle. *Dev Dyn* **231**: 258-269.
- Siegel RJ (1985) Palatal grafts for eyelid reconstruction. *Plast Reconstr Surg* **76**: 411-414.
- Stevens A, Zuliani T, Olejnik C, LeRoy H, Obriot H, Kerr-Conte J, Formstecher P, Bailliez Y, Polakowska RR (2008) Human dental pulp stem cells differentiate into neural crest-derived melanocytes and have label-retaining and sphere-forming abilities. *Stem Cells Dev* **17**: 1175-1184.
- Svendsen CN, Bhattacharyya A, Tai YT (2001) Neurons from stem cells: preventing an identity crisis. *Nat Rev Neurosci* **2**: 831-834.
- Swierenga SH, Auersperg N (1982) Proliferation in low calcium medium as a marker for malignancy: an apparent exception among human carcinoma cells. *Cancer Lett* **15**: 179-183.
- Taneyhill LA (2008) To adhere or not to adhere: the role of Cadherins in neural crest development. *Cell Adh Migr* **2**: 223-230.
- Taneyhill LA, Schiffmacher AT (2013) Cadherin dynamics during neural crest cell ontogeny. *Prog Mol Biol Transl Sci* **116**: 291-315.
- Tarzemany R, Jiang G, Larjava H, Häkkinen L (2015) Expression and function of connexin 43 in human gingival wound healing and fibroblasts. *PLoS One* **10**: e0115524.
- Techawattanawisal W, Nakahama K, Komaki M, Abe M, Takagi Y, Morita I (2007) Isolation of multipotent stem cells from adult rat periodontal ligament by neurosphere-forming culture system. *Biochem Biophys Res Commun* **357**: 917-923.
- Teng L, Labosky PA (2006) Neural crest stem cells. *Adv Exp Med Biol* **589**: 206-212.
- Toma JG, Akhavan M, Fernandes KJ, Barnabe-Heider F, Sadikot A, Kaplan DR, Miller FD (2001) Isolation of multipotent adult stem cells from the dermis of mammalian skin. *Nat Cell Biol* **3**: 778-784.
- Toma JG, McKenzie IA, Bagli D, Miller FD (2005) Isolation and characterization of multipotent skin-derived precursors from human skin. *Stem Cells* **23**: 727-737.
- Tucker RP (2001) Abnormal neural crest cell migration after the *in vivo* knockdown of tenascin-C expression with morpholino antisense oligonucleotides. *Dev Dyn* **222**: 115-119.
- Weber M, Apostolova G, Widera D, Mittelbronn M, Dechant G, Kaltschmidt B, Rohrer H (2015) Alternative generation of CNS neural stem cells and PNS derivatives from neural crest derived peripheral stem cells. *Stem Cells* **33**: 574-588.
- Weinberg DA, Tham V, Hardin N, Antley C, Cohen AJ, Hunt K, Glasgow BJ, Baylis HI, Shorr N, Goldberg RA (2007) Eyelid mucous membrane grafts: a histologic study of hard palate, nasal turbinate, and buccal mucosal grafts. *Ophthal Plast Reconstr Surg* **23**: 211-216.

Widera D, Grimm WD, Moebius JM, Mikenberg I, Piechaczek C, Gassmann G, Wolff NA, Thevenod F, Kaltschmidt C, Kaltschmidt B (2007) Highly efficient neural differentiation of human somatic stem cells, isolated by minimally invasive periodontal surgery. *Stem Cells Dev* **16**: 447-460.

Widera D, Hauser S, Kaltschmidt C, Kaltschmidt B (2012) Origin and regenerative potential of vertebrate mechanoreceptor-associated stem cells. *Anat Res Int* **2012**: 837626.

Widera D, Zander C, Heidbreder M, Kasperek Y, Noll T, Seitz O, Saldamli B, Sudhoff H, Sader R, Kaltschmidt C, Kaltschmidt B (2009) Adult palatum as a novel source of neural crest-related stem cells. *Stem Cells* **27**: 1899-1910.

Xu X, Chen C, Akiyama K, Chai Y, Le AD, Wang Z, Shi S (2013) Gingivae contain neural-crest- and mesoderm-derived mesenchymal stem cells. *J Dent Res* **92**: 825-832.

Yagita Y, Sakurai T, Tanaka H, Kitagawa K, Colman DR, Shan W (2009) N-cadherin mediates interaction between precursor cells in the subventricular zone and regulates further differentiation. *J Neurosci Res* **87**: 3331-3342.

Yoshida T, Vivatbutsiri P, Morriss-Kay G, Saga Y, Iseki S (2008) Cell lineage in mammalian craniofacial mesenchyme. *Mech Dev* **125**: 797-808.

Zhang Q, Shi S, Liu Y, Uyanne J, Shi Y, Shi S, Le AD (2009) Mesenchymal stem cells derived from human gingiva are capable of immunomodulatory functions and ameliorate inflammation-related tissue destruction in experimental colitis. *J Immunol* **183**: 7787-7798.

Zhou Y, Snead ML (2008) Derivation of cranial neural crest-like cells from human embryonic stem cells. *Biochem Biophys Res Commun* **376**: 542-547.

Web references

1. <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> (01/01/2015)
2. <http://mfold.rit.albany.edu/?q=mfold/RNA-Folding-Form> (01/01/2015)

Discussion with Reviewers

Reviewer I: This work describes a method to generate spheres from human gingival cells, which allows enrichment of progenitors with neural crest features and ability to differentiate into neurons. These data open several questions related to the identity of gingival progenitors: Are the spheres containing stem cells able to self-renew and generate secondary spheres? Are gingival cells in the spheres still capable of differentiating into mesenchymal cell types? In other terms, does the *in vitro* culture system devised by the authors enrich for multipotent neural crest-like stem cells of gingival origin?

Authors: This is a key question and a logical avenue for future research. It will be very interesting to assess whether the neurosphere-enriched populations possess better or different multipotent differentiation potential than their parental cultures. Therefore, this culture system may open new possibilities for isolation of cells for various

therapeutic or research approaches. Obtaining tissue biopsies from human gingiva for cell isolation is easy with very little morbidity, making this approach practical and highly feasible. In addition, standard human gingival fibroblast stocks available in many laboratories could be used to enrich these cells for research purposes.

Reviewer I: Neural crest-derived stem cells are easily accessible and ethically unquestioned resources for regenerative medicine. What are the major advantages of NCSCs from the gingiva compared to other readily and minimally-invasive accessible sources of such cells like adipose tissue?

Authors: As the research techniques and understanding to assess the developmental origin of various cells have progressed, several tissues, including dermis and adipose tissue, previously thought to originate from mesoderm, have been shown to contain a subpopulation of cells that have neuroectodermal (neural crest) origin. Subsequent experiments have further shown that these cells, indeed, have differentiation potential beyond the traditional mesenchymal lineages, and can also generate neural cell types. This has opened up novel avenues to isolate and utilise neural crest-derived cells for research and trials for clinical applications. For utility of any therapeutic cell type, an easy, non-invasive and abundant source is an advantage. For this reason, adipose tissue appears a promising source of these cells. Human gingiva is another easily accessible tissue where wound healing after biopsy is fast with very little morbidity. Furthermore, many laboratories have for decades collected and used gingival fibroblasts for various purposes, and these cultures are readily available to study neural crest-like cells. It will be important in the future to compare in further detail the abundance of these cells in various tissues, and cell cultures established from them. Furthermore, it is possible that these cells have distinct properties based on their tissue origin. Such differences have been suggested to arise during migration of the neural crest-derived cells to their final destination, and may also be dependent on the local tissue niche. Therefore, comparing characteristics of neural crest-derived cells from various adult tissue origins will be important for their future utility in research and therapy.

Reviewer III: What is the proof that human cells isolated from adult gingival tissue are neural crest-derived?

Authors: This is an important question. Lineage tracing experiments that are widely used tools in transgenic animals to assess cellular origins cannot be applied in human tissues. Determining NC origin in human cells is complicated by the fact that there is currently no single specific NC marker that would explicitly point to the NC-origin of cultured cells. Therefore, in human tissues and cells we usually have to utilise indirect evidence from various approaches. In the present study, we show that gingival cells express a set of genes that have been previously associated with the NC-phenotype in various contexts in the literature. As further evidence, we also assessed neurosphere generation and neuronal-like differentiation potential, both previously described characteristic of NC-cells. However, we appreciate that

this evidence cannot provide explicit proof that the cells are NC-derived, but suggest that this is a possibility as the cells display many of the NC-like properties.

Reviewer III: To what extent do the authors believe that NC-derived cells from adult tissues are able to behave like embryonic NC cells?

Authors: The NC-derived cells in adult oral tissues can be considered post-migratory NC cells that may have undergone phenotype changes after they have migrated out of their original niche to their adult tissue location. Therefore, they may have lost some of the characteristics of the embryonic NC cells. However, an intriguing question is whether they may display characteristics of embryonic NC cells when exposed to the embryonic tissue niche. Several studies have shown the importance of the tissue niche to regulate progenitor cell phenotype. An interesting finding

from the present study was the molecular composition and organisation of the neurospheres formed by the gingival cells. Neurospheres were composed of distinctly organised and polarised extracellular matrix, reminiscent of embryonic neural crest, which was underlying the highly polarised nestin positive cells. Thus, this mode of culture allowed the adult cells to produce a tissue niche that showed some similarities to the embryonic niche. A very interesting future study would be to test the effect of the embryonic-like vs. adult gingiva tissue niche on adult gingiva-derived cell phenotype, and whether embryonic-like ECM can be used to further enhance the NC cell phenotype.

Editor's Note: Scientific Editor in charge of the paper: Martin Stoddart.

III^{ème} PARTIE

ETUDE ET CARACTERISATION DES SOUS-POPULATIONS DE CELLULES SOUCHES GINGIVALES HUMAINES (CSGH)

OBJECTIFS

Depuis plusieurs années, des cellules progénitrices multipotentes appelées «cellules souches mésenchymateuses » (CSM) ont été isolées *in vitro* à partir de tissus conjonctifs d'origine diverses comme la moelle osseuse (Kuznetsov et al., 1997), le tissu adipeux (Zuk et al., 2001), le cordon ombilical (Erices et al., 2000), le système nerveux central, la peau (Shih et al., 2005), le foie (Campagnoli et al., 2016). Les CSM sont définies par trois caractéristiques principales: (1) elles expriment un ensemble de marqueurs de surface prédéfinis, (2) elles ont une capacité d'auto-renouvellement, et (3) elles sont capables de se différencier en cellules filles spécialisées. Néanmoins une question peut se poser, les CSM sont-elles toutes homogènes et multipotentes ou sont-elles un mélange de cellules déjà engagées dans différentes lignées de différenciation. *In vitro*, l'analyse clonale permet de répondre à cette question et pouvoir caractériser la composition de cellules souches d'une population. De ce fait, il a été montré *in vitro* qu'une population de cellules souches mésenchymateuses peut-être génétiquement homogène sans être pure à 100% ; et ainsi être constituée de sous-populations dites « clonales ». La capacité dite de « clonogenicité » est la capacité des CSM à maintenir un potentiel prolifératif, c'est-à-dire à s'auto-renouveler *in vitro* à partir d'une seule cellule en formant des colonies de cellules appelées « CFU-F » (Colony Forming Unit Fibroblastic). Ces CFU donneront à leur tour naissance à d'autres types de cellules plus spécialisées. Cette capacité des CSM à former des clones ou colonies est un modèle *in vitro* ayant permis de montrer qu'une population de CSM est en réalité un pool de plusieurs sous-populations cellulaires ou sous-ensembles de cellules progénitrices. L'intérêt grandissant pour l'utilisation clinique des CSM, exige de normaliser les méthodes permettant d'obtenir des populations de cellules à haute capacité de régénération ou encore à haute multipotence.

En effet, de nombreuses études montrent que les colonies ou CFU-F obtenues *in vitro* à partir d'une population initiale de CSM peuvent présenter des caractéristiques différentes ; comme une morphologie ou encore des capacités de prolifération et de différenciation différentes sans pour autant démontrer une quelconque relation entre celles-ci (Hakkinen & Larjava, 1992; Russell et al., 2011). Cependant, les sous populations de CSM apparaissent très hétérogènes *in vitro*, et peuvent être hiérarchisées selon leur capacité de multipotence (Tormin et al., 2009). Par exemple, l'équipe de Russel a pu montrer que les clones obtenus à partir d'une population de CSM présentent des potentiels de multipotence dans les lignées adipo-, chondro- et ostéoblastique différents ; certains pourront ainsi être uni-, bi-, ou tripotent. Plus encore, ces capacités semblent évoluer dans l'espace-temps. Premièrement ; les sujets jeunes ont une fréquence de clones tripotents significativement plus élevée que des sujets âgés ; ce qui semble confirmer que la fréquence des CFU-F est inversement proportionnelle à l'âge (Quarto et al., 1995). Deuxièmement, les clones issus d'un même sujet entrent progressivement en sénescence, et perdent de fait leur potentiel initial multipotent; donnant naissance à des cellules ayant une capacité de multipotence moins élevée (uni- ou bipotent) (Muraglia et al., 2000). Ainsi, plusieurs paramètres autre que le temps semblent influencer la culture des CSM et de ses sous-populations tels que les conditions ou densité d'ensemencement, la méthode de clonage ou encore les produits et milieux de culture utilisés. Pour finir, il n'existe actuellement pas de réels marqueurs ou épitopes de surface permettant la discrimination des sous-populations. Néanmoins, certains antigènes à l'image de Stro-1 présents sur les CFU-F des cellules de moelle osseuse humaine, ont été décrits comme pouvant être des marqueurs potentiels de sous-populations de CSM *in vitro*; bien que la présence de ceux-ci évoluent dans le temps (Gronthos et al., 1994). Par exemple, il a été montré dans un modèle murin NOD/SCID irradié, que la co-greffe de cellules hématopoïétiques CD34+ avec une sous-population de CSM humaines Stro-1 positives présentait une meilleure capacité d'implantation tissulaire contrairement à la sous-population Stro-1 négative qui elle semble avoir un meilleur impact sur la prise de greffe des progéniteurs hématopoïétiques (Bensidhoum et al., 2004). Néanmoins, l'origine des capacités d'autorenouveaulement ou encore de multipotence d'une population de CSM n'est pas claire. Dans le passé, les chercheurs ont lié cette multipotence à l'expression d'un ensemble de gènes Oct4, Sox2, Nanog, Klf4, c-Myc, Rex1 ou encore Lin28 appelés « gène de pluripotence ». Fait intéressant, la transfection de certains de ces gènes dans des cellules somatiques adultes permet de ramener le potentiel de différenciation d'une cellule à son état embryonnaire, générant ainsi des cellules souches pluripotentes induites (iPSC). Par conséquent, l'expression

de ces gènes de pluripotence peut s'avérer importante dans le maintien du phénotype des cellules souches et de leur potentiel en matière de régénération tissulaire.

Les cellules souches mésenchymateuses dérivées de la gencive humaine (CSG) représentent une source prometteuse pour la thérapie cellulaire. Comme vu précédemment, un consensus doit être établi en ce qui concerne la méthode d'isolation des fibroblastes à partir de biopsie de gencive, car la méthodologie d'isolation semblent modifier les propriétés des cellules obtenues ou encore leur potentiel de différenciation. De plus, l'origine des attributs d'une population de CSG n'est pas claire ; et n'a jamais été étudiée jusqu'à présent. Qu'en est il des sous-populations qui la constituent ; y a-t-il une ou plusieurs sous-populations impliquées dans ces propriétés (FIG. 1A)? Pouvons-nous trouver des marqueurs (ou gènes) prédictifs permettant d'isoler ces sous-populations en fonction de leurs propriétés? L'étude et la caractérisation des propriétés de celles-ci pourraient s'avérer nécessaires dans le but d'améliorer l'utilisation des CSG en thérapie cellulaire (Lari Häkkinen et al., 2014).

L'objectif de cette étude est de réaliser une analyse clonale *in vitro* de populations de fibroblastes gingivaux afin d'étudier et comparer les caractéristiques des sous-populations de cellules qui la constituent après expansion. Nous avons observé s'il existait des relations entre la morphologie, la prolifération et le potentiel de différenciation des différents clones, et comment ces paramètres évoluaient au cours du temps. Enfin, plusieurs gènes liés à des cellules pluripotentes induites souches (Klf4, c-Myc, Rex1, Lin28, Sox2, Nanog et Oct4) ont été étudiés afin de les mettre en corrélation avec les propriétés précédentes.

MATERIEL ET METHODE

Isolation

Toutes les cultures de fibroblastes gingivaux (FG) humains ont été obtenues à partir de biopsies issues de 3 donneurs cliniquement sains et de sexe masculin. Le site de biopsie a pu être mandibulaire (2 donneurs) ou palatin (1 donneur). Tous les patients ont donné leur consentement éclairé conformément à la Déclaration d'Helsinki (1975). Les biopsies ont ensuite étéensemencées pour établir des cultures parentales hétérogènes de fibroblaste (FG) en utilisant la méthode d'isolation par explant. En bref, les biopsies de chaque patient ont été lavées deux fois dans une solution de PBS 1X (tampon phosphate salin) additionné à 1% de pénicilline et 1% de streptomycine ; émincées avec un scalpel stérile afin de n'obtenir que le

tissu conjonctif puis ont été découpées. Chaque morceau obtenu a ensuite été placé dans une boîte de culture en plastique de 6 cm² pendant 10 à 15 min avec une goutte de milieu de culture ; pour permettre sa fixation sur la surface en plastique. Ensuite, la boîte a été remplie de milieu de prolifération cellulaire constitué de DMEM-Glutamax à faible teneur en glucose (1g/L) contenant 10% de sérum bovin fœtal (SBF), 1% d'acides aminés non-essentiels MEM 100X (Gibco®), 1% Pénicilline-Streptomycine (10,000 U/mL) (Gibco®), 0,5% Fungizone® Antimycotic (Gibco®) et 50 µg / ml d'acide ascorbique 2L phosphate et incubée à 37 ° C dans une atmosphère humidifiée contenant 5% de CO₂. Le milieu a ensuite été remplacé deux fois par semaine jusqu'à obtention de la sortie des cellules et d'une confluence cellulaire à 70 – 80%.

Ensuite, des sous-populations de fibroblastes ont été obtenues *in vitro* à partir de la culture parentale de fibroblaste en utilisant deux méthodes dites de « clonage » permettant de former des clones: Colony Forming Unit (CFU-F) ou Single Cell Derived (SCD).

Méthode de clonage

Technique CFU-F

Pour la technique de CFU-F, les cellules ont été décollées à l'aide de trypsine / EDTA, comptées et ensemencées à une faible densité (<50 cellules / cm²) dans des boîtes de culture 10 cm afin d'être cultivées. Pour chaque souche 6 boîtes de culture 10 cm ont été ensemencées. Après 10 jours, des colonies visibles à l'examen microscopique se sont formées et ont été criblées (Fournier et al., 2010; QZ. Zhang et al., 2012). Les colonies contenant plus de 50 cellules ont été sélectionnées et séparées des autres par un anneau de clonage, puis trypsinées et ensemencées dans une nouvelle boîte de culture 10 cm afin d'être amplifiées. Le milieu a ensuite été remplacé deux fois par semaine jusqu'à obtention de la sortie et d'une confluence cellulaire à 70 – 80% (Guilak et al., 2006). Les colonies de plus de 50 cellules ont été sélectionnées et baptisées « clones » pour la suite de l'étude.

Technique SCD par dilution limite

Pour la technique SCD, les cellules ont été décollées à l'aide de trypsine / EDTA, comptées puis diluées par une dilution en série afin de pouvoir ensemencer une seule cellule par puits dans des plaques 96 puits. A cet effet, pour augmenter les chances de n'obtenir qu'une seule cellule dans chaque puits ; la dilution finale a été calculée afin de n'ensemencer que 0,8 cellules par puits. Pour une souche, 3 boîtes de 96 puits ont été ensemencées. Le lendemain,

les puits ne contenant qu'une seule cellule ont été sélectionnés afin d'éliminer les puits contenant 0 ou 2 cellules. Le milieu a ensuite été remplacé une fois par semaine. Après 10 jours, des colonies visibles à l'examen microscopique se sont formées. Ces colonies ont été trypsinées etensemencées dans une nouvelle boîte de culture 10 cm afin d'être amplifiées. Le milieu a ensuite été remplacé deux fois par semaine jusqu'à obtention de la sortie et d'une confluence cellulaire à 70 – 80%. Les colonies de plus de 50 cellules ont été sélectionnées et baptisées « clones ». Les cellules composant ces clones ont alors été décollées à l'aide de trypsine / EDTA, etensemencées dans des boîtes 12 puits, avant d'êtreensemencées à nouveau dans une nouvelle boîte de culture 10 cm afin d'être amplifiée.

Ainsi, les clones obtenus à partir de ces 2 techniques représentent des sous-populations de la culture parentale de fibroblastes gingivaux et ont été comparés dans cette étude.

Coloration au Bleu de Toluidine

Après avoir été rincées une fois avec du tampon phosphate salin (PBS 1X), les cellules ont été fixées à l'aide d'une solution de paraformaldéhyde 4% / saccharose 5% pendant 10 min à 4°C puis rincées trois fois avec du PBS. Après ce rinçage, les cellules ont été colorées au bleu de toluidine (Sigma-Aldrich) pendant 20 min à température ambiante, puis rincées.

Analyse morphologique

La forme des cellules a été observée après coloration immuno-histologique au cours de la prolifération ainsi qu'à la confluence par microscopie à fluorescence (Zeiss).

Taux de formation des clones (Colony forming efficiency)

Un clone doit par nature avoir une haute capacité de renouvellement. Ont donc été considérés comme clones dans cette étude, les colonies contenant au moins 50 cellules après 14 jours d'ensemencement. Dans la technique SCD, le taux de formation des clones correspond au nombre de clones formés par rapport au nombre de cellulesensemencées.

Temps de doublement de la population (PDT)

La cinétique de prolifération des clones a été mise en évidence de 2 manières différentes :

- Dans la technique SCD, le nombre de jours mis pour obtenir la confluence dans un puits d'une boîte 12 puits (500 000 cellules) à partir d'une seule a été évalué.

- Concernant les différentes sous-populations, les temps de doublement ont été comparés au cours des passages 2, 4 et 6. Brièvement, les cellules ont été trypsinisées, comptées et ensemencées avec un même nombre de cellules. A 80% de confluence, le nombre total de cellules dans chaque boîte a été compté sur lame de Malassez.

Ainsi, le temps de doublement de la population (PDT) a été calculé en utilisant l'équation suivante: $X/[(\text{LOG}(\text{NF}-\text{NI})) / \text{LOG}2]$; où "NF" est le nombre final de cellules, "NI" est le nombre initial et "X" le temps en heures.

Tests de multipotence *in vitro*

Voie ostéogénique

Une différenciation ostéogénique a été induite en cultivant les cellules dans du DMEM-Glutamax à faible teneur glucose (1g/L) contenant 10% de SBF, 1% d'acides aminés non-essentiels MEM 100X (Gibco®), 1% Pénicilline-Streptomycine (10,000 U/mL) (Gibco®), 0,5% Fungizone® Antimycotic (Gibco®), 50 ng / ml d'acide ascorbique 2L phosphate, 100 nM de dexaméthasone, 10^{-7} M de vitamine D3 (Sigma-Aldrich), et 10 mM de bêta-glycérophosphate (Sigma-Aldrich). Après 14 jours de culture, la minéralisation a été analysée par une coloration à l'Alizarin Red S (Sigma-Aldrich).

Voie adipogénique

La différenciation adipocytaire a été induite en cultivant les cellules dans du DMEM-Glutamax à forte teneur glucose (4g/L) contenant 10% de SBF, 1% d'acides aminés non-essentiels MEM 100X (Gibco®), 1% Pénicilline-Streptomycine (10,000 U/mL) (Gibco®), 0,5% Fungizone® Antimycotic (Gibco®), 0,5 mM d'isobutylméthylxanthine, 100 nM de dexaméthasone, 10 µg / ml d'insuline et 50 µM d'indométhacine (Sigma-Aldrich). La formation de vacuoles lipidiques a été évaluée par une coloration à l'Oil Red O (Sigma-Aldrich) après 14 jours de culture.

Voie chondrogénique

La différenciation chondrogénique a été réalisée en cultivant les cellules en 3 dimensions sous forme de « micromass » à l'aide d'un milieu approprié. Après avoir été trypsinisées et comptées, 400 000 cellules ont été centrifugées (500 g / 5 min) et mises en culture sous forme de « micromass » dans des tubes en polypropylène de 15 ml (Falcon, BD Biosciences, Mississauga, Ontario, Canada). La différenciation a été induite pendant 2 semaines par un

milieu sans sérum contenant DMEM-Glutamax à forte teneur glucose (4g/L), 1% d'acides aminés non-essentiels MEM 100X (Gibco®), 1% Pénicilline-Streptomycine (10,000 U/mL) (Gibco®), 0,5% Fungizone® Antimycotic (Gibco®), 100 nM de dexaméthasone (Sigma-Aldrich), 1% de ITS+ (acide insulino-transferrine-sélénieux + de Life Technologies Corporation), 50 ng / ml d'acide ascorbique 2L phosphate (Sigma ALDRICH), 40 pg / ml L-proline, pyruvate (Sigma-Aldrich) et 10 ng/mL de TGF-β3 (Biovision Inc., Milpitas, CA, USA). La différenciation chondrocytaire a été évaluée par une coloration au Bleu de Toluidine (Sigma-Aldrich) après 14 jours de culture.

Voie myofibroblastique

Une différenciation myofibroblastique a été induite en cultivant les cellules dans du milieu de prolifération supplémenté en TGF-β1 (10 ng/mL). Au bout de 5 jours, la différenciation a été mise en évidence par immuno-histochimie.

Immuno-Histochimie

Les cellules ont été fixées en utilisant une solution de PBS 1X contenant 4% de paraformaldéhyde - 5% de saccharose durant 15 minutes à 4°C ; puis perméabilisées en utilisant 0,5% de Triton X-100. Pour bloquer une éventuelle coloration non spécifique, les cellules ont été incubées pendant 20 minutes avec du PBS 1X contenant 1% de BSA / 1 % de la glycine à 37 ° C. Puis les cellules ont été mises au contact de l'anticorps primaire à 37 ° C pendant 2 h ainsi qu'avec l'anticorps secondaires appropriés à 37 ° C pendant 1 h. Les noyaux cellulaires ont été colorés en utilisant le DAPI. Les anticorps utilisés pour la coloration immunologique étaient les suivantes : 1/200 anti-α-SMA (ab5694; ABCAM, Paris, France). Les anticorps secondaires étaient AlexaFluor594 chèvre anti-souris (Life Technologies Corporation). Puis les cellules ont été mises au contact d'un mélange fluorochrome-phalloïdine (1/200) et DAPI (1/4000) à 37 ° C pendant 20 minutes et rincées trois fois. Les colorations ont été observées en utilisant un microscope à fluorescence Zeiss équipé d'un appareil photo numérique.

Évaluation quantitative et qualitative de la multipotence

Chaque clone de chaque lignée a été différencié dans les lignées mésenchymateuses ostéo-, adipo-, chondro- et myofibroblastiques; afin de les classer de 0 à 4 selon leur capacité de multipotence : zéro-, uni-, bi-, tri- ou quadripotent. De plus, la qualité de la différenciation a été évaluée de manière visuelle après coloration histologique. Une échelle d'évaluation

visuelle allant de zéro (absence de différenciation) à quatre (meilleure différenciation) a permis de comparer les différentes différenciations entre elles.

Analyse par cytométrie de flux (FACS)

La cytométrie de flux (FACS) a été effectuée pour analyser certains marqueurs de surface des cellules ou marqueurs membranaires (CD29, CD44, CD45, CD90, CD105, p75NTR et SSEA4) afin de vérifier entre autres le phénotype de cellules souches mésenchymateuses. Pour nos expériences de caractérisation, deux types de marquage ont été utilisés. Le marquage direct avec un anticorps primaire déjà conjugué et un marquage indirect avec un anticorps secondaire conjugué à l'anticorps primaire. Pour se faire, les cellules ont été trypsinées, lavées dans du PBS et comptées afin d'être analysées par cytométrie de flux comme décrit ci-après.

Marquage direct

10⁵ cellules ont été incubées avec 10 ng/mL d'anticorps primaire marqué préparé dans une solution de PBS / BSA 3%; pendant 60 minutes à 4 ° C dans l'obscurité. Les cellules ont ensuite été lavées 3 fois avec du PBS par centrifugation à 400 g pendant 5 minutes. Puis elles ont été remises en suspension dans 500µL de la solution de PBS / BSA 3%, conservées dans l'obscurité sur de la glace avant d'être analysées. Les anticorps utilisés dans cette technique de marquage direct ont été : PE anti-mouse CD146 Antibody et Alexa Fluor® 647 anti-human STRO-1 Antibody (BioLegend)

Marquage indirect

Ce marquage dit « indirect » nécessite deux étapes d'incubation, d'abord avec un anticorps primaire, puis avec un anticorps secondaire compatible. 10⁵ cellules ont été incubées avec 10 ng/ml d'anticorps primaire dilué dans une solution de PBS / BSA 3%; pendant 60 minutes à 4 ° C dans l'obscurité. Les cellules ont été lavées 3 fois avec du PBS par centrifugation à 400 g pendant 5 minutes. Elles ont ensuite été remises en suspension en présence de 1/200 d'anticorps secondaire marqué par un fluorochrome dilué dans une solution de PBS / BSA à 3% et incubées pendant 30 minutes à 4 ° C dans l'obscurité. Les cellules ont été relavées 3 fois avec du PBS par centrifugation à 400 g pendant 5 minutes et remises en suspension dans 500µL de la solution de PBS / BSA 3% et conservées dans l'obscurité sur de la glace avant d'être analysées peu après. Les anticorps primaires utilisés dans cette technique de marquage direct ont été : CD29, CD44, CD45, CD73, CD90, CD105, p75NTR, SSEA4 (Abcam et

Biolegend). Des cellules seules ainsi que des cellules marquées avec l'anticorps secondaires ont servi de témoin.

Analyse de l'expression des ARNm par qRT-PCR

Les ARN ont été extraits des cultures cellulaires en utilisant une solution Tri Reagent (Molecular Research Center) selon le protocole du fabricant. La concentration des ARN ainsi que la pureté ont été évaluées par spectrophotométrie (Nanodrop, Thermo Scientific, Wilmington, MA, USA). Seuls les échantillons avec un rapport DO260/280 au-dessus de 1,8 ont été utilisés pour cette étude. L'ADNc a été rétro transcrits en utilisant le kit Superscript II (Invitrogen, France) selon les instructions du fabricant. Toutes les amorces ont été conçues et analysées par le logiciel BLASTn (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Pour les réactions de qRT-PCR, les produits RT ont été dilués (à 5ng/mL) et mélangés avec 7,5µl de KapaFastSYBR2X (Kapa Biosystems, Wilmington, MA, USA), 3.5 pmoles de primers, pour un volume final de 15µl. L'amplification par PCR en temps réel a été effectuée sur le système Bio-Rad CFX96 (Bio-Rad Laboratories) en utilisant le programme suivant: un cycle à 94°C pendant 3 min, 35 cycles à 95°C pendant 5 s, et la réaction achevée après lecture de plaque et analyse de la melting curve de 65°C à 95°C, 5 s pour chaque 0,5°C. Les gènes SDHA (succinate deshydrogenase complex subunit A flavoprotein) et UBC (ubiquitine C) ont été utilisés en tant que gènes de référence. Des ARN non rétro-transcrits et de l'eau stérile ont été utilisés comme témoins négatifs. Les réactions de PCR ont été réalisées en triplicate pour chaque échantillon. Les données ont été analysées sur la base de la méthode de $2\Delta\Delta C_t$ comparative (CFX Software Manager Version 2.1, Bio-Rad Laboratories). Pour les séquences d'amorces, voir le Tableau N°2. Les produits de PCR ont également été migrés sur un gel d'agarose afin de confirmer la bonne taille de l'amplicon.

Tableau N°1- Séquences des primers utilisés

Gènes	Séquences (5'>3')	Taille d'amplicons (bp)	Numéro d'accension
<i>cMYC</i>	TCAAGAGGCGAACACACAAC GGCCTTTTCATTGTTTTCCA	110	<u>NM_002467.4</u>
<i>FOXD3</i>	F: AGTGAAGCCGCCTTACTCGTACAT R: AGGAAGCTGCCGTTGTCGAACAT	265	NM_012183.2
<i>KLF4</i>	F: CAGCTTCACCTATCCGATCCG R: GACTCCCTGCCATAGAGGAGG	87	

<i>LIN28</i>	F: GAAGCGCAGATCAAAGGAG R: GCTGATGCTCTGGCAGAAGT	115	NM_024674
<i>NANOG</i>	F: ACCTATGCCTGTGATTTGTGG R: AAGAGTAGAGGCTGGGGTAGG	472	
<i>Nestin</i>	F: CAGCGTTGGAACAGAGGTTGG R: GGCTGGCACAGGTGTCTCAAG	392	NM_006617.1
<i>OCT4A</i>	F: CCTTCGCAAGCCCTCATT R: TTTGATGTCCTGGGACTCCT	474	NM_203289.4
<i>OCT4B1</i>	F: AGACTATTCCTTGGGGCCACAC R: CTCAAAGCGGCAGATGGTCCG	492	NM_001285986.1
<i>OCT4B</i>	F: AGACTATTCCTTGGGGCCACAC R: CTTAGAGGGGAGATGCGGTCA	267	NM_203289.4
<i>PAX3</i>	F: TGTTTCAGCTGGGAAATCCGAGA R: AGCTGTTCTGCTGTGAAGGTGGTT	309	NM_181457.3
<i>PPAR</i>	F: GCGATTCCCTCACTGATAC R: CTTCCATTACGGAGAGATCC	234	NM_015869.4
<i>REX1</i>	F: CATCGCTGAGCTGAAACAAA R: CTGCTGGACTGTGAGCACTACT	92	NM_174900
<i>SDHA</i>	F:AGC AAG CTC TAT GGA GAC CT R:TAA TCG TAC TCA TCA ATC CG	200	NM_004168.3
<i>SNAI1</i>	F: TCGGAAGCCTAACTACAGCGA R: AGATGAGCATTGGCAGCGAG	140	NM_005985.3
<i>SOX2</i>	F: ATGGGTTTCGGTGGTCAAGTC R: GTGGATGGGATTGGTGTCTC	426	
<i>SOX9</i>	F: CTGTAGGCGATCTGTTGGGG R:AGCGAACGCACATCAAGAC	85	NM_000346.3
<i>TWIST</i>	F: TGCAGCTATGTGGCTCACGA R: CCCACGCCCTGTTTCTTTGA	266	NM_000474.3

Analyse statistique

L'analyse statistique a été réalisée en utilisant le test de Bonferroni à l'aide du logiciel PrismGraphPad5 (GraphPad Software Inc, La Jolla, CA, USA). Les résultats sont présentés sous forme de moyenne \pm écart-type (SD). Les résultats ont été considérés comme significatifs avec une valeur de $p < 0,05$. (Sur les graphes *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$).

RESULTATS

Cette étude a été réalisée en trois parties. La première partie du travail a consisté à isoler et amplifier des clones à partir de 3 souches cellulaires ; en comparant les deux méthodes d'obtention décrites précédemment : CFU-F ou SCD (FIG. 1B). En effet, les souches N°1 et N°2 ont été obtenues à l'aide de la méthode CFU-F contrairement à la lignée

N°3 obtenue à partir de la méthode CFU. La deuxième partie a consisté à étudier la multipotence de 16 clones issus de la souche N°3. Six clones ont alors été sélectionnés afin de les étudier plus précisément selon plusieurs paramètres tels que leur morphologie, leurs marqueurs de surface ou encore leurs capacités de différenciation.

PARTIE N°1

Isolation des clones

Les deux méthodes comparées ont permis l'isolation de clones formés de cellules adhérentes au plastique dans les 3 souches cellulaires testées (FIG. 1C). Après 14 jours, dans la méthode SCD, 41,3% des puitsensemencés ont entraîné la formation de clones de plus de 50 cellules ; tandis que 17,5% contenaient moins de 50 cellules (FIG. 1D). Les 41,2% restant ont représenté les puits vides ouensemencés par 2 cellules considérés comme des faux-positifs. De la même manière bien que ce soit beaucoup plus difficile à quantifier, environ 31,94% des cellulesensemencées ont entraîné la formation de clones dans la méthode par CFU-F (résultat non montré). Ces résultats obtenus ont néanmoins été très technicien dépendant.

Morphologie des clones

Durant cette étude, plusieurs morphologies de divisions cellulaires ont été observées en « épis », en « étoile », ou encore en « fuseau »; mais elles ont toutes abouti à la formation de clones ayant une forme relativement identique. Les cellules ont présenté une forme d'épingle caractéristique du fibroblaste lors de leur prolifération ou à confluence, mais elles ont pu apparaître plus ou moins espacées au cours de leur prolifération (FIG. 1E et G). Les colonies de moins de 50 cellules, ont présenté des cellules pouvant avoir une morphologie beaucoup plus large dite « en étoile » ; avec un cytoplasme agrandi et de forme irrégulière (FIG. 1F).

Prolifération

Dans cette première partie, la cinétique de prolifération des clones a été mise en évidence en évaluant le temps (en jours) mis par un clone pour arriver à confluence dans un puits d'une boîte 12 puits ; soit le nombre de jours nécessaire pour obtenir 500 000 cellules à partir d'une seule. Des différences ont été observées entre les différents clones d'une même souche; les clones des souches N°1 et N°2 ont mis environ 40 jours pour atteindre la confluence (FIG. 1H et I). Des clones plus rapides, atteignant la confluence après 25 jours ont néanmoins été observés dans la souche N°3 (FIG. 1J). Ainsi, en fonction des souches ou au sein d'une même souche, tous les clones ne prolifèrent pas de la même manière. Une des premières contraintes

liées à la méthode SCD est alors apparu. Contrairement à la méthode CFU-F réalisée dans de plus grande boîte, la méthode SCD a demandé plusieurs repiquages dans le but d’obtenir un nombre conséquent de cellules à étudier.

Capacité de multipotence

Dans cette première partie, la capacité de multipotence de chaque clone a été évaluée après différenciation dans les lignées ostéo- et adipogénique dans les 3 souches cellulaires sélectionnées. Ainsi, pour chaque souche, a été mis en évidence les clones différenciant uniquement en une lignée ostéo- ou adipogénique (O ou A), les clones différenciant à la fois en lignée ostéo- et adipogénique (O/A), ainsi que les clones ne différenciant en ni l’un ni en l’autre (Neg) (FIG. 1K). Une certaine hétérogénéité intra et inter-souches de la multipotence a été observée. Cette capacité de multipotence a ensuite tenté d’être reliée au temps moyen de doublement correspondant à chaque clone (FIG. 1L). Là encore, aucune correspondance n’a pu être établie entre les différentes lignées cellulaires; les clones de la souche N°3 atteignant plus rapidement la confluence n’ont pas montrés une capacité de multipotence particulière.

Ainsi, des clones de fibroblastes gingivaux ont pu être formés à partir des deux méthodes distinctes décrites dans cette étude: CFU-F et SCD. Si aucune différence n’a réellement été mise en évidence dans cette étude, des différences techniques ont néanmoins été observées. De plus, deux morphologies de colonies ont été observées, les clones avec des cellules « en épingles » prolifératives et des colonies de quelques cellules en « étoiles ».

PARTIE N°2

Pour cette seconde partie, 16 clones issus de la souche N°3 (appelée aussi souche JN) présentant la plus grande homogénéité dans les résultats précédemment obtenus ont été sélectionnés au hasard pour la suite de l’étude.

Capacité de multipotence

Les 16 clones sélectionnés ont été différenciés dans les lignées myofibroblastique, ostéo-, adipo- et chondrogénique. Comme pressenti, tous les clones se sont différenciés dans la lignée myofibroblastique, mais pas dans toutes les lignées mésenchymateuses. C’est

pourquoi; ces clones ont été classés en fonction de leur multipotence (0, uni, bi ou tripotent) (Tableau N°2).

Tableau N° 2 : Tableau des capacités de différenciations dans les 3 lignées mésenchymateuses à passage précoce (Y: les cellules se différencient; N: aucune différenciation).

CLONES	Ostéogénique	Adipogénique	Chondrogénique	Potence (/3)
GF JN	Y	Y	Y	3
JN1	Y	Y	Y	3
JN2	Y	N	N	1
JN3	Y	Y	Y	3
JN4	N	N	Y	1
JN5	N	N	Y	1
JN6	N	Y	Y	2
JN7	Y	N	N	1
JN8	N	N	N	0
JN9	Y	Y	Y	3
JN10	Y	N	Y	2
JN11	Y	Y	Y	3
JN12	N	N	Y	1
JN13	Y	Y	Y	3
JN14	Y	Y	Y	3
JN15	Y	N	Y	2
JN16	N	Y	N	1

37,5% des clones étaient tripotents, 18,7% étaient bipotents, tandis que seulement 6,25 était zéropotent (FIG2. A). Néanmoins, une fois les colorations histologiques de chaque différenciation réalisées ; des différences ont été observées pour une même différenciation. C'est pourquoi, la qualité de chaque coloration histologique a été évaluée visuellement et notée d'un score allant de 0 à 3. Plus le score fut élevé, plus la coloration et la différenciation obtenues furent importantes. Ainsi, les clones N° 8 et N°9 ont présentés la plus faible et la meilleure multipotence respectivement (FIG 2. B). Ce test de multipotence a donc permis de mettre en évidence l'existence d'un pool de clones multipotents coexistant parmi d'autres ayant des capacités plus restreintes.

FIGURE N°1

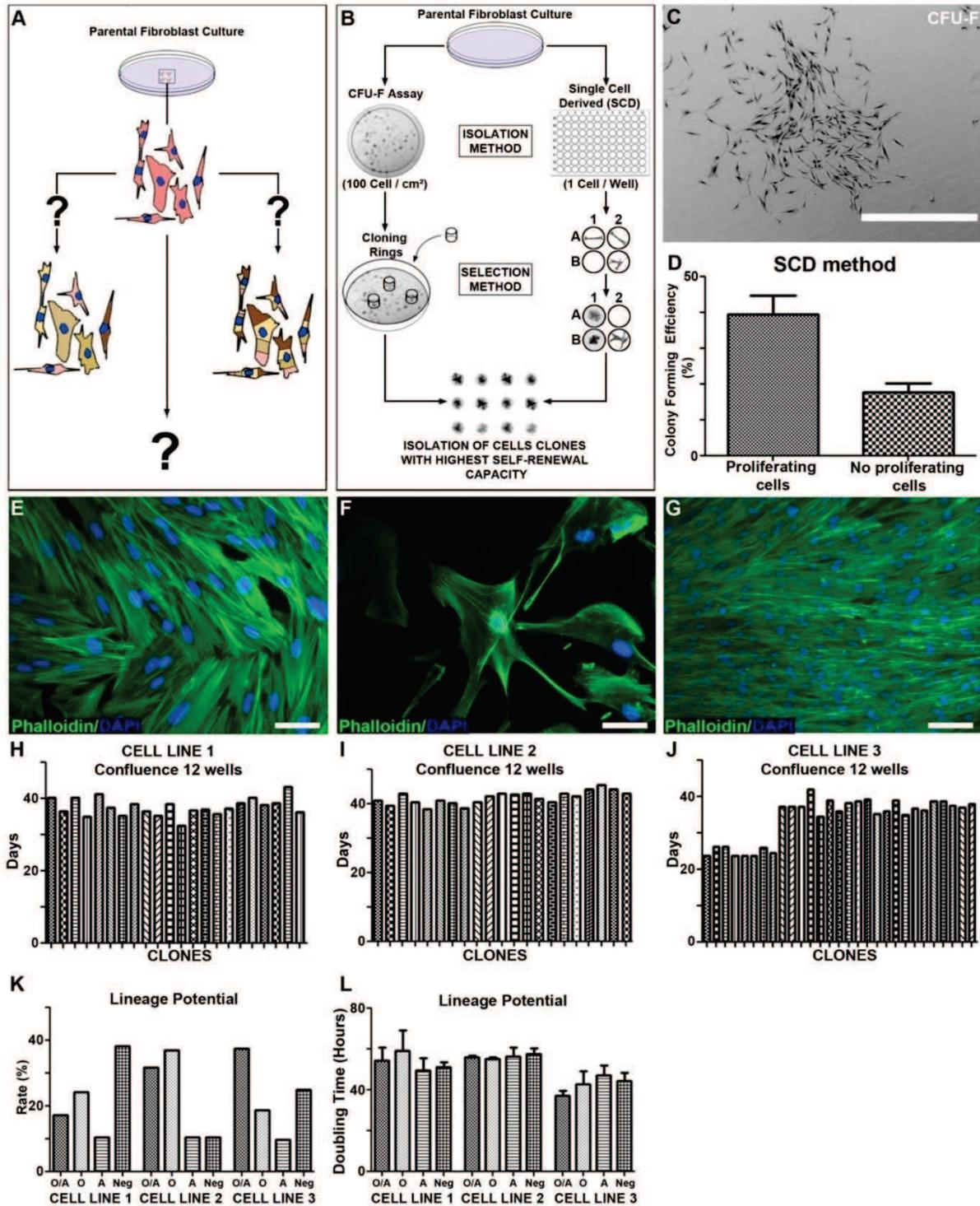


Figure 1 .A). Représentation schématique de la question initiale posée dans cette étude. B). Représentation schématique des protocoles d'isolation des clones. C). Photographie microscopique d'un clone formé par la méthode CFU-F, coloré à la Toluidine bleue après 14 jours. Echelle = 100µm. D). Schéma représentatif du taux de formation des clones à partir de la méthode SCD (en %) après 14 jours. E,F,G). Immunohistochimie à la phalloïdine du cytosquelette des cellules d'un clone (E) et d'une colonie de moins de 50 cellules(F) après 20 jours ; ainsi qu'à confluence (G). H, I et J). Graphiques représentant le nombre de jours mis par un clone pour atteindre la confluence dans une boîte 12 puits. K). Evaluation des clones selon leur capacité de multipotence, dans les différentes lignées (en %). L). Evaluation du temps de doublement des clones selon leur capacité de multipotence, dans les différentes lignées (en heures). (O/A : ostéo/adipo, O :ostéo seul, A : adipo seul, Neg : ni adipo, ni ostéo).

Tableau N° 3 : Tableau des scores de chaque différenciation dans les 3 lignées mésenchymateuses à passage précoce, basés sur les colorations spécifiques obtenues.

CLONES	Ostéogénique Score (/3)	Adipogénique Score (/3)	Chondrogénique Score (/3)	Total Score (/9)
GF JN	2	2	1	5
JN1	3	1	3	7
JN2	1	0	0	1
JN3	1	1	3	5
JN4	0	0	2	2
JN5	0	0	1	1
JN6	0	1	2	3
JN7	2	0	0	2
JN8	0	0	0	0
JN9	2	2	2	6
JN10	2	0	3	5
JN11	3	1	1	5
JN12	0	0	2	2
JN13	1	3	2	6
JN14	1	3	2	6
JN15	1	0	2	3
JN16	0	4	0	4

PARTIE N°3

Dans le but de comprendre si certains paramètres prédictifs (marqueurs de surface, gènes) étaient reliés à la multipotence ; quatre clones tripotents (1, 9, 11, 13), un clone unipotent ostéogénique et un clone zéropotent ont alors été sélectionnés pour la troisième partie de cette étude.

Prolifération

Les temps de doublement des clones sélectionnés ont été comparés au cours des passages 2, 4 et 6. Aucune différence significative n'a été observée entre les clones au cours de ces passages. Néanmoins, plus le nombre de passage augmente, plus le temps de doublement des clones augmente; contrairement à celui de la population parentale JN qui a semblé très peu varier.

Capacité de multipotence à passage tardif (après 6 passages)

A des passages plus tardifs, les capacités de multipotence ont évolué. Globalement la qualité des différenciations a diminué par rapport aux mêmes tests de différenciation réalisés à des passages précoces. De plus, la multipotence a semblé changer ; par exemple le clone N°13 a perdu des capacités de différenciation tandis que le clone N°8 en a gagné (Tableau N°2 et N°4).

Tableau N° 4 : Tableau des capacités et scores de différenciations dans les 3 lignées mésenchymateuses à passage tardif (Y: les cellules se différencient; N: aucune différenciation).

CLONES	Ostéogénique		Adipogénique		Chondrogénique		Total	
		Score (/3)		Score (/3)		Score (/3)		Score (/9)
GF JN	Y	2	Y	3	Y	1	3	6
JN1	Y	1	N	0	Y	3	2	4
JN2	Y	3	N	0	N	0	1	3
JN8	N	0	Y	1	Y	2	2	3
JN9	Y	2	Y	2	Y	2	3	6
JN11	N	0	Y	2	Y	3	2	5
JN13	N	0	N	0	Y	2	1	2

Analyse par cytométrie de flux (FACS)

Tout d'abord, la caractérisation des clones par cytométrie de flux a montré que les clones sélectionnés présentaient les marqueurs de surface des cellules souches mésenchymateuses: CD29+, CD44+, CD73+, CD90+, CD105+ mais ne présentaient pas le marqueur hématopoïétique CD45-. Il en a été de même pour la population parentale JN (FIG. 3A). Néanmoins, la proportion de certains marqueurs a pu varier entre les différents clones (FIG. 2F). Si la proportion de cellules STRO1 positives (marqueur retrouvé au niveau des précurseurs ostéoblastiques) s'est avérée sans différence et quasiment nulle dans les clones étudiés; la proportion de cellules CD146 positives (marqueur de péricytes) a été significativement plus importante dans les clones N°2 (89,9%) et N°11 (72,2%) (Tableau N°5). De même le marqueur SSEA4 (retrouvé entre autres dans les cellules ES indifférenciées) a été retrouvé sur quasiment la moitié des cellules composants les clones N°8 (51,5%), N°11 (43,6%) et N°13 (46,7%). Le marqueur P75NRT, n'a pas été détecté dans les clones N°1, N°8 et N°13 mais était présent en petit pourcentage (2-5% des cellules) dans les autres clones.

FIGURE N°2

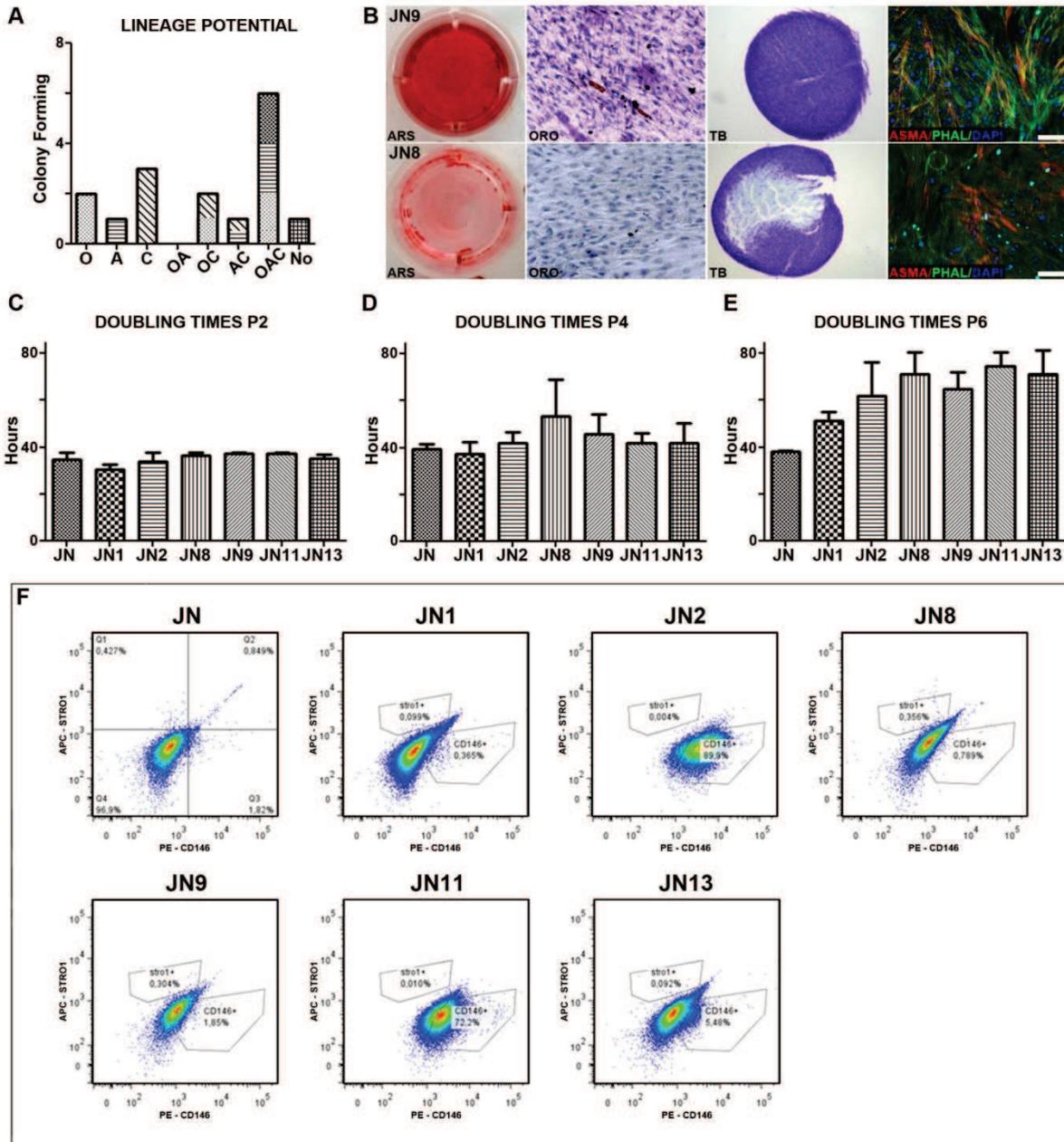


Figure 2. A). Evaluation des clones selon leur capacité de multipotence, dans la souche N°3. (O : ostéo seul, A : adipo seul, C : chondro seul, O/A : ostéo/adipo, O/C : ostéo/chondro, O/A/C : ostéo/adipo/chondro, No : ni adipo, ni ostéo, ni chondro). B). Comparaison des différenciations ostéo, adipo, chondrogénique et myofibroblastique des clones avec le meilleur (N°9) et le plus faible (N°8) potentiel de différenciation ; selon l'évaluation de leur coloration spécifique. Echelle = 100µm. C,D et E). Comparaison des temps de doublement des clones sélectionnés au cours des passages. F). Caractérisation des marqueurs Stro1 et CD146 par cytométrie de flux des clones sélectionnés.

Tableau N° 5 : Tableau de marqueurs membranaires.

Marqueur	JN	JN1	JN2	JN8	JN9	JN11	JN13
STRO1	0,427%	0,099%	0,004%	0,3565%	0,304%	0,010%	0,092%
CD146	1,82%	0,365%	89,9%	0,789%	1,85%	72,2%	5,48%
P75NTR	0,321%	1,21%	2,53%	0%	5,41%	3,83%	1,71%
SSEA4	21,5%	8,23%	22,4%	51,5%	20%	43,6%	46,7%

Origine embryologique

L'analyse par qRT-PCR de l'expression relative des ARNm des gènes Snail, Twist1, Pax3, Sox9, nestine et Foxd3, ainsi que la migration par électrophorèse sur gel d'agarose des produits de PCR ont permis de montrer que les clones sélectionnés, à l'image de leur population parentale, exprimaient les marqueurs crête neurale. Aucune différence significative n'a en revanche été observé entre les différents clones ; hormis pour le gène nestine entre les clones N°2 et N°9.

Pluripotence

Pour finir, plusieurs gènes reliés à la pluripotence ou encore aux cellules souches embryonnaires ont été étudiés. A l'image de la culture parentale tous les clones sont positifs pour c-Myc, Klf4, FoxD3 (FIG. 4A) et négatifs pour Sox2, Lin28, Rex1 ou encore Nanog (FIG. 5A – Tableau N°6). Certains gènes ont été considérés comme négatifs car le NRT (non rétro-transcrit), servant de contrôle était aussi exprimé. Néanmoins, aucune différence n'a permis de discerner les clones selon ces gènes.

Dans les cellules souches embryonnaires, le facteur de transcription Oct-4A est considéré comme un facteur clé dans le maintien de l'auto-renouveau et de la pluripotence des cellules souches (Pan, Chang, Schöler, & Pei, 2002). Ce facteur a trois isoformes (Oct-4A, Oct-4B et le nouvel Oct-4B1) qui partagent le même locus du gène et peuvent être générés par épissage alternatif (FIG. 5B). Dans cette étude, tous les clones ont exprimés les isoformes B et B1 (FIG. C) à passage précoce. Mais seulement les clones N°9 et N°13 ainsi que la population parentale ont exprimé le traditionnel isoforme Oct4A.

Tableau N° 6 : Tableau résumant la migration sur gel d'agarose suite à l'analyse par RT-PCR conventionnelle de l'expression des gènes relatifs à la pluripotence ou aux cellules souches embryonnaires (Y: les cellules se différencient; N: aucune différenciation).

CLONES	CMY C	SOX2	KLF4	LIN28	REX 1	NANOG	OCT4A	OCT4B	OCT4B + B1	OCT4 B1
GF JN	Y	N	Y	N	N	N	Y	Y	Y	Y
JN1	Y	N	Y	N	N	N	Y	Y	Y	Y
JN2	Y	N	Y	N	N	N	N	Y	Y	Y
JN8	Y	N	Y	N	N	N	N	Y	Y	Y
JN9	Y	N	Y	N	N	N	Y	Y	Y	Y
JN11	Y	N	Y	N	N	N	N	Y	Y	Y
JN13	Y	N	Y	N	N	N	Y	Y	Y	Y

FIGURE N°3

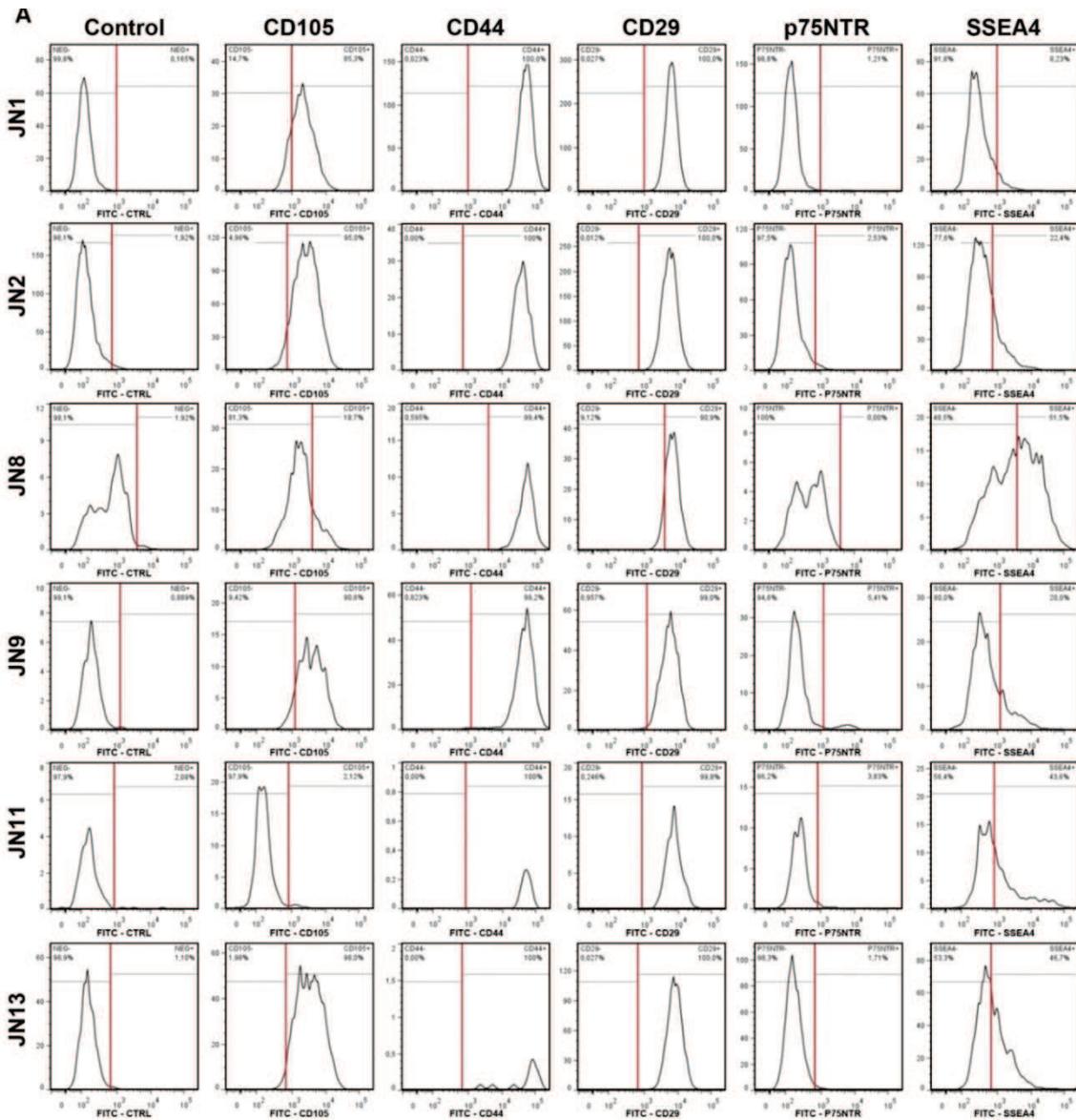


Figure 3. A). Caractérisation des marqueurs CD29, CD44, CD105, p75NTR et SSEA4 par cytométrie de flux des clones sélectionnés.

FIGURE N°4

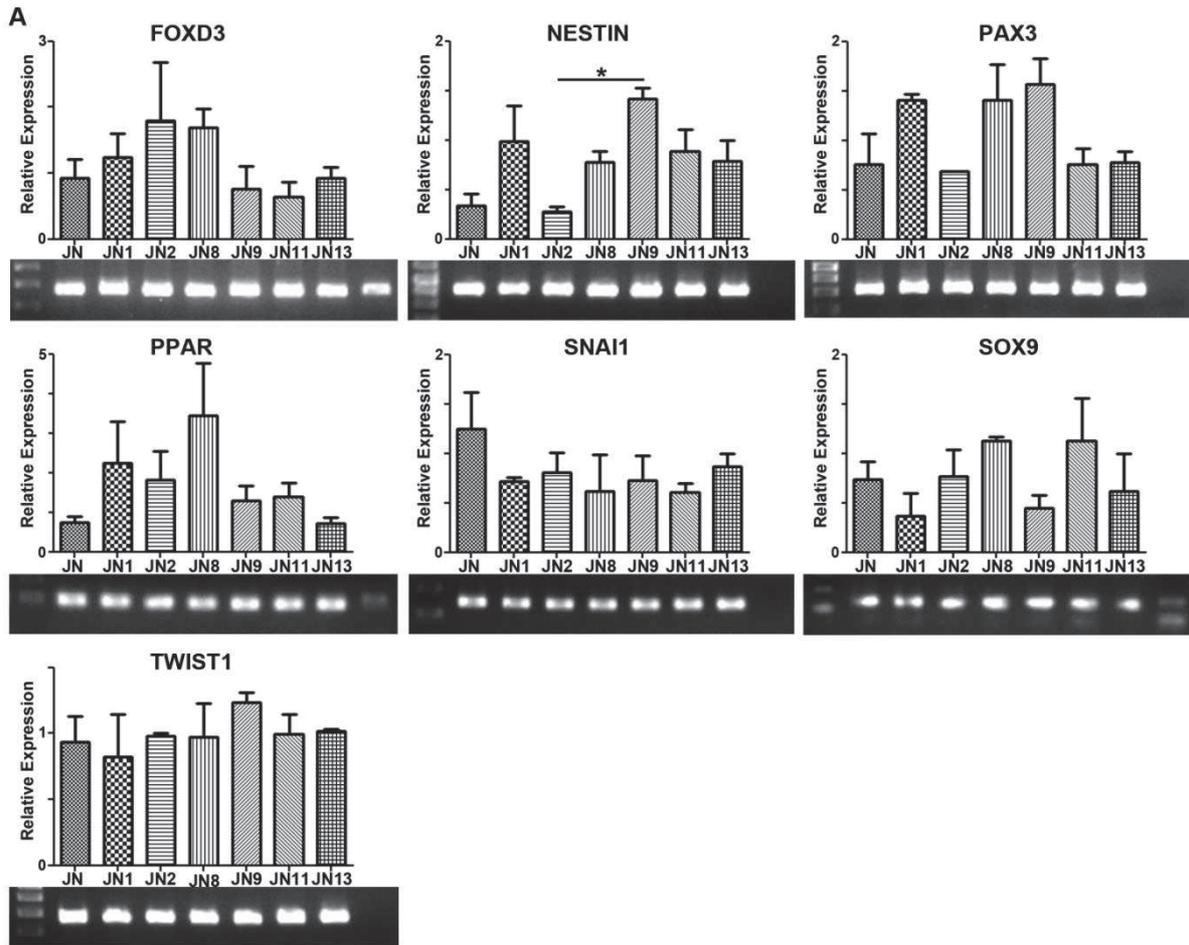


Figure 4. A). Quantification de l'expression relative des ARNm des gènes relatifs aux crêtes neurales Snai1, Twist1, Pax3, Sox9, nestin et Foxd3 par RT-PCR ; et migration par électrophorèse sur gel d'agarose des produits de PCR.

FIGURE N°5

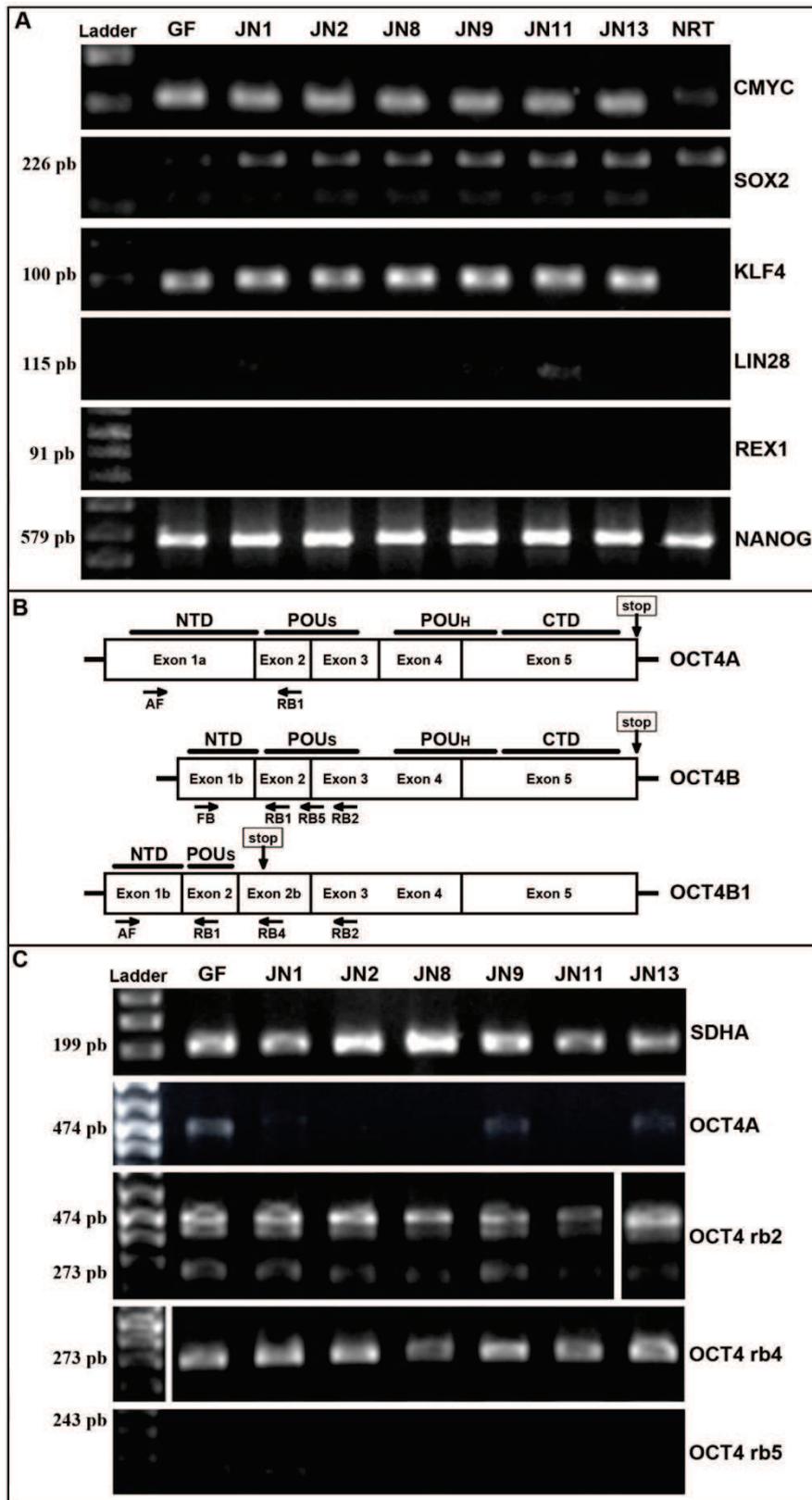


Figure 5. A). Migration par électrophorèse sur gel d'agarose des produits de PCR des gènes relatifs à la pluripotente cMyc, Lin28, Rex1 et Nanog. B). Schéma représentant les différentes isoformes pouvant être obtenu suite à l'épissage alternatif de l'ARNm du gène Oct4. C). Migration par électrophorèse sur gel d'agarose des produits de PCR des gènes Oct4A, Oct4 rb2, Oct4 rb4 et Oct4 rb5. (NRT= ARN non rétro-transcrit)

DISCUSSION

Le principal objectif de cette étude clonale a été d'étudier les sous-populations de cellules composant la population parentale de fibroblastes gingivaux *in vitro*. Face à l'intérêt grandissant pour l'utilisation clinique de ce type de cellule, la sélection de sous-populations à haute capacité de régénération ou encore à haute multipotence peut s'avérer être un réel atout. La première partie de ce travail a donc consisté à isoler et sélectionner des clones *in vitro* à partir de 3 souches cellulaires ; en comparant deux méthodes différentes de formation de clones.

Obtention - isolation

Des clones de fibroblastes gingivaux peuvent être formés à partir des deux méthodes distinctes décrites dans cette étude: CFU-F et SCD. Si aucune différence n'a réellement été mise en évidence dans cette étude, des différences techniques ont été observées. En effet, la valeur de cette étude a imposé d'être sûr qu'une seule cellule avait bien été ensemencée dans chaque puits. Ainsi, plusieurs contraintes ont été observées ou subies lors de la méthode SCD. Premièrement, qu'elle soit marquée ou non, il a fallu s'assurer de la présence de cette unique cellule dans chaque puits de la boîte 96 puits (en triplicate bien sûr) dès l'adhésion post ensemencement, afin de discriminer les puits contenant aucune ou 2 cellules (faux positifs). Et un puits si petit soit-il paraît toujours bien grand sous le microscope. De plus, une fois à confluence dans 1 puits de la boîte 96 puits, plusieurs repiquages ont été nécessaires dans le but d'obtenir un nombre conséquent de cellules à étudier. En effet, une expansion trop rapide dans des boîtes de trop grands diamètres pourrait entraîner à son tour la formation de CFU-F issues d'un premier clone. Face à ces contraintes, la première idée a été d'ensemencer 1 cellule dans une boîte de plus grand diamètre (12 puits) et ainsi accélérer le processus d'obtention d'un grand nombre de cellules ; cependant il s'est avéré encore plus difficile de contrôler la présence ou non d'une unique cellule. Ainsi la seconde idée a été d'ensemencer 1 seule cellule à l'aide d'un tri cellulaire par cytométrie de flux, mais les premiers essais ont montré que même la machine n'ensemencait pas forcément qu'une seule cellule et que la encore le technicien devait à son tour réaliser un contrôle visuel ; c'est pourquoi les essais de méthode SCD réalisée par FACS ont été retirés de ce travail. Néanmoins, si cette technique contraignante paraît plus compliquée à mettre en œuvre ; elle a l'avantage d'obtenir des clones purs issus d'une cellule. En effet, dans la technique CFU-F, rien ne prouve que les clones sélectionnés par anneaux de clonage ne contiennent pas de cellules ayant migrées d'un clone voisin.

Origine et Multipotence

Dans cette étude, dans la souche sélectionnée, l'expression de gènes relatifs aux crêtes neurales (nestine, Snai1, Twist1, Pax3, Sox9 et FoxD3) par les fibroblastes gingivaux (FG) ainsi que les clones qui en dérivent semblent apporter une nouvelle preuve de l'origine neurectodermique des fibroblastes gingivaux. Le but de notre étude était aussi de comprendre la composition d'une population de fibroblastes gingivaux en établissant des clones issus de cette population. De plus, le test de multipotence a mis en évidence l'existence d'un pool de 37,5% de clones multipotents coexistant parmi d'autres ayant des capacités plus restreintes. Plusieurs études clonales réalisées sur des CSM dérivées de la moelle osseuse ont montrés des taux de clones multipotentes de 20 à 40% de la population totale (Kuznetsov et al., 1997). Cependant, une certaine hétérogénéité dans la qualité des différenciations a été mise en évidence au sein des différents clones multipotents. Aussi, les capacités de multipotence des clones semblent évoluer dans l'espace-temps comme on a pu notamment le montrer après plusieurs passages. Nous apportons la preuve dans cette étude *in vitro* que les cellules fibroblastiques gingivales sont hétérogènes ; et contiennent à la fois des sous-populations multipotentes et d'autres déjà orientées dans une voie de différenciation. Néanmoins, aucune corrélation ne peut être établie avec le temps de doublement des clones.

Un corollaire de ce travail est le dénombrement de cellules souches mésenchymateuses parmi la population des fibroblastes gingivaux : si une cellule souche se définit par sa capacité d'auto-renouveaulement, son adhésion au plastique et sa multipotence, nous pouvons l'évaluer en se servant du nombre de clones par cellulesensemencées en CFU et de la quantité de clones tri- ou bi- potents. Pour les cellules gingivales, cela nous donne $31.94\% \times (37.5\% + 18.5\%) = 17.9\%$. Selon cette approche nous pouvons donc estimer le taux de cellules souches mésenchymateuses parmi les fibroblastes gingivaux à presque 18%. Ce résultat est bien supérieur et sûrement plus proche de la réalité que le chiffre évalué en 2010 par notre équipe.

Marqueurs spécifiques et Gènes liés à la pluripotence ou aux cellules souches embryonnaires

L'identification ou la sélection prospective *in vitro* des clones à haute capacité multipotente s'avérerait un réel atout pour la recherche à des fins thérapeutiques. Il est apparu important d'identifier des marqueurs mésenchymateux, de cellules souches ou reliées à la pluripotence par cytométrie de flux et RT-PCR ; pouvant être utilisés à cet effet. Tout d'abord, la caractérisation des clones par cytométrie de flux a montré que les clones sélectionnés présentaient les marqueurs de surface des cellules souches mésenchymateuses. Néanmoins, la

proportion de certains marqueurs a pu varier entre les différents clones. Stro1 est une protéine de surface cellulaire, caractéristique des cellules progénitrices mésenchymateuses (Gronthos et al., 1994), est nécessaire pour le maintien d'un pool de cellules indifférenciées (Miura et al., 2003; Seo et al., 2004). Dans notre étude, la proportion de cellules Stro1 positives (marqueur retrouvé au niveau des précurseurs ostéoblastiques) s'est avérée sans différence et quasiment nulle dans les clones étudiés. La proportion de cellules CD146 positives a été significativement plus importante dans les clones N°2 (89,9%) et N°11 (72,2%). De même le marqueur SSEA4 (retrouvé entre autres dans les cellules ES indifférenciées) a été retrouvé sur quasiment la moitié des cellules composants les clones N°8 (51,5%), N°11 (43,6%) et N°13 (46,7%). Néanmoins; les quantités variables du marqueur de cellule de souche SSEA4 peuvent suggérer l'existence d'une population hétérogène de cellules différenciées et multipotentes dans chaque clone. Cependant, le mélange de cellules entre les clones au cours de la culture n'est pas à exclure. Le marqueur p75NTR, fortement exprimé par les cellules souches de la crête neurale embryonnaire ou neurales n'a pas été détecté dans les clones N°1, N°8 et N°13 mais était présent en petit pourcentage (2-5% des cellules) dans les autres clones. Nous pouvons donc conclure, d'après ces travaux, qu'aucun des marqueurs de surface étudiés n'est directement lié à la multipotence.

Plusieurs gènes liés à la pluripotence, à l'auto-renouvellement ou encore aux cellules souches ont également été investigués. Certains ont même été utilisés dans le cadre de la reprogrammation de cellules somatiques afin de former des cellules souches iPS. Rex1 et Lin28 sont clairement négatifs. Pour Sox2, il est difficile de conclure en n'ayant recours à des techniques plus complexes, en effet ce gène ne possède pas d'introns et il est de fait très difficile de montrer une non expression vu qu'il est quasi impossible de séparer complètement l'ADN génomique de l'ARN messager. Contrairement à nos espérances et à celles d'autres équipes, l'expression intrinsèque de ces gènes n'est pas corrélée avec les capacités de différenciation multipotentes de cellules gingivales. Ces facteurs de transcription sont exprimés par les cellules souches embryonnaires humaines et sont essentiels pour la mise en place et l'entretien des cellules souches pluripotentes indifférenciées.

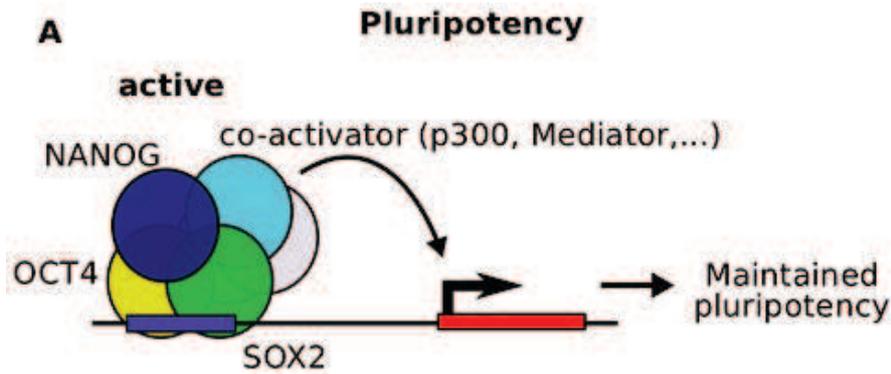


Figure 15 Schéma de la régulation génétiques des gènes Oct4, Nanog et Sox2 (Göke et al., 2011)

Le facteur de transcription Oct4 est un gène maître de l'auto-renouveaulement des cellules souches embryonnaires. Si l'expression d'Oct4A semble limitée aux CSE, Oct4B peut être retrouvés dans des cellules non pluripotentes. Le variant Oct4B1 est principalement exprimé dans les CSE et son expression semble diminuer au cours des différenciations (Atlasi, Mowla, Ziaee, Gokhale, & Andrews, 2008).

Néanmoins un grand débat sur Oct4 a suivi l'invention des iPS (Takahashi & Yamanaka, 2006). De nombreux auteurs se sont intéressés aux « magic four » (Oct4, Sox2, Klf4 et c-Myc). Des rapports puis des articles ont rapporté l'expression de ces facteurs dans les cellules adultes et particulièrement dans les cellules souches adultes. Néanmoins Liedtke en 2007 avait prévenu de la difficulté d'évaluer Oct4 à cause des pseudogènes de ce gène (Liedtke, Enczmann, Waclawczyk, Wernet, & Kögler, 2007). En dehors de ces pseudogènes, 3 épissages alternatifs existent et seule la forme Oct4A est associée à la pluripotence. Les ARNm Oct4B et Oct4B1 sont retrouvés dans les cellules adultes et semblent liés au stress oxydatif plus qu'aux cellules souches. La forme Oct4B1 peut donner 3 protéines dont les fonctions n'ont pas encore été identifiées. Atlasi en 2008, grâce à une grande rigueur dans la construction des primers, permet de nier l'existence d'expression d'Oct4A dans les cellules adultes différenciées et de montrer l'erreur de travaux antérieurs qui détectaient justement les formes B ou B1 (Atlasi et al., 2008). S'inspirant de ces travaux et suivant sa méthodologie, nous avons pu mettre en évidence une expression d'Oct4A dans quelques clones multipotents. C'est la seule corrélation que nous ayons pu mettre en évidence entre l'expression d'un gène et la multipotence. Nous restons néanmoins à un niveau d'expression très faible si comparée à celle des CSE.

Pour conclure sur Nanog et Sox2, il faudra mener des expériences de biologie moléculaires plus spécifiques. En particulier pour sélectionner des primers de Nanog qui évitent les 11 pseudogènes existants dans le génome humain et le site d'initiation alternatif dont le rôle n'a pas été élucidé.

CONCLUSION

La présente étude de caractérisation de clones *in vitro* a démontré que les fibroblastes de gencive humaine sont une population hétérogène composés de sous populations cellulaires ayant une capacité de différenciation différente. Ces sous-populations sont capables d'auto-renouveaulement, expriment les marqueurs de surface cellulaire liée aux CSM, peuvent se différencier dans les lignées mésenchymateuses et présentent les caractéristiques de cellules souches mésenchymateuses dérivées des crêtes neurales. Cette étude montre aussi que seulement une partie des cellules sont multipotentes tandis que le reste de la population présente des phénotypes variés. Le gène Oct4A semble être corrélé avec la capacité à se différencier dans les 3 lignées ostéo, chondro et adipogénique. En outre de nouvelles études *in vitro* seront nécessaires pour confirmer ce travail. Notre étude comporte certaines limites, comme un faible nombre de clones testés et dans des conditions de culture *in vitro* différentes du microenvironnement *in vivo*. Ainsi, les cellules progénitrices engagées de manière irréversible peuvent être créées par des conditions de culture *in vitro*.

IV^{ème} PARTIE**ETUDE DE LA MULTIPOTENCE INDUITE POUR LES CELLULES SOUCHES GINGIVALES HUMAINES (CSGH)****OBJECTIFS**

Le tissu adipeux est un tissu conjonctif contenant deux types de cellules graisseuses, appelées « adipocytes », ainsi que d'autres types cellulaires constituant le stroma-vasculaire du tissu adipeux ; telles que des fibroblastes, des macrophages, des cellules sanguines ou endothéliales. Les adipocytes blancs uniloculaires caractérisés par une énorme goutte lipidique, assurent la synthèse, le stockage et la libération des lipides ; et sécrètent un grand nombre de peptides comme par exemple la leptine. Les adipocytes bruns sont multiloculaires, contiennent de nombreuses gouttelettes lipidiques et participent à la thermogénèse, grâce à la phosphorylation d'acide gras dans leurs nombreuses mitochondries. Des mitochondries qui ont la particularité d'être très riches en cytochrome, donnant sa couleur brune à la cellule.

Les adipocytes se développent à partir de cellules souches adultes appelées « pré-adipocytes ». Ces pré-adipocytes formeront soit des adipocytes en fonction de la balance énergétique, des conditions hormonales et de nutrition ; où resteront en réserve toute la vie. Le phénotype adipocytaire est caractérisé par l'accumulation intracellulaire de gouttelettes lipidiques, ainsi que l'expression de gènes spécifiques des adipocytes. Le processus d'adipogenèse implique des facteurs de transcription et des protéines du cycle cellulaire, qui contrôlent l'expression des gènes et du développement des adipocytes. Par exemple, le récepteur nucléaire PPAR γ (nuclear-receptor peroxisome proliferators activated receptor γ) joue un rôle crucial dans l'adipogenèse en permettant le maintien de l'état différencié de l'adipocyte (Rosen & MacDougald, 2006; Tamori, Masugi, Nishino, & Kasuga, 2002).

L'induction adipogénique présentant des implications importantes dans le rôle fonctionnel du tissu adipeux ; le mécanisme de l'adipogenèse a été étudié assidûment. Contrairement à ce qui se passe *in vivo*, des facteurs d'induction sont nécessaires pour induire les cellules souches mésenchymateuses *in vitro* vers une lignée spécifique. Néanmoins, beaucoup de méthodes ou milieux de culture, facteurs de croissance ou encore additifs sont proposés pour cette induction, voilà pourquoi le choix du milieu de culture n'est pas aussi

évident qu'il y paraît. Quatre principaux facteurs d'induction ont d'abord été décrits dans la littérature: le sérum bovin fœtal (SBF), l'isobutyl-méthyl-xanthine, la dexaméthasone ainsi que l'insuline (Scott, Nguyen, Levi, & James, 2011; Zuk et al., 2001). De plus, d'autres groupes d'étude ont proposé de nouveaux milieux de culture sans sérum dans lesquels l'indométacine peut être remplacée soit par un cocktail de T3 et de pioglitazone ou par un mélange de rosiglitazone, de transferrine et de cortisol. Toutefois, le rôle précis de ces additifs utilisés dans l'induction de la différenciation adipocytaire *in vitro* n'est pas clair (Vater, Kasten, & Stiehler, 2011).

Les objectifs de ce travail sont : 1- de comparer les effets *in vitro* de plusieurs milieux classiquement retrouvés dans la littérature sur les cellules souches gingivales 2- de comprendre et évaluer le rôle *in vitro* des composants pro-adipogéniques sur la différenciation adipocytaire sur les cellules souches gingivales afin d'établir un protocole fiable et adapté. Pour ce faire, plusieurs lignées de cellules souches dérivées de la gencive seront sélectionnées et comparées à des lignées de cellules souches adipeuses. Ainsi, la viabilité, la prolifération, la morphologie ou encore l'accumulation de lipides dans les cellules différenciées durant 7 et 21 jours seront étudiées. La compréhension des événements moléculaires qui régulent la différenciation des adipocytes peut notamment être nécessaire pour de futures applications cliniques, pour prévenir les maladies métaboliques ou encore à l'inverse exercer un contrôle du processus de différenciation ostéogénique, qui est le pendant opposé de la différenciation adipocytaire.

MATERIEL ET METHODE

Obtention des cellules

Les cellules souches dérivées du tissu adipeux (ASC) utilisées dans cette étude, ont été achetées chez Zen-Bio Inc. Deux lignées ont été utilisées pour la réalisation des expériences. Toutes les cultures de fibroblastes gingivaux (FG) humains ont été obtenues à partir de biopsies de donneurs adultes cliniquement sains ; lors d'actes de chirurgie dentaire sous anesthésie locale. Tous les patients ont donné leur consentement éclairé conformément à la dernière version de la Déclaration d'Helsinki (1975) ; et ont nié avoir récemment pris des médicaments pouvant affecter le métabolisme du tissu conjonctif. Chacune des biopsies a ensuite été utilisée pour établir des cultures primaires de cellules en utilisant la méthode de

l'explant. Comme vu précédemment dans ce manuscrit, une dilution limite à environ 50 cellules / cm² a permis la réalisation de CFU-F qui une fois à confluence ont donné une population cellulaire présentant les critères requis de cellules souches mésenchymateuses issues de la gencive.

Au cours des précédents travaux, la capacité de multipotence ostéo, adipo et chondrogénique de plusieurs populations de CSG a pu être testée. Ainsi, après avoir acheté 2 souches de cellules souches mésenchymateuses adipeuses humaines (ASC) ; 6 souches différentes de cellules souches mésenchymateuses issues de la gencive (GSC) ont été sélectionnées et regroupées selon leur capacité de différenciation : 3 souches différenciant dans les 3 lignées ostéo, adipo et chondrogéniques (GSC D) et 3 souches différenciant principalement dans la lignées ostéogénique et en faible quantité (GSC ND).

Culture des cellules

Les 8 souches cellulaires ASC, GSC D et GSC ND ont été cultivées et amplifiées dans un milieu de prolifération a été utilisé constitué de DMEM à faible teneur en glucose (DMEM-LG1g/L, pyruvate – Gibco®) contenant 10% de sérum bovin foetal (SBF), 1% d'acides aminés non-essentiels MEM 100X (Gibco®), 1% Pénicilline-Streptomycine (10,000 U/mL) (Gibco®), 0,5% Fungizone® Antimycotic (Gibco®) et 50 µg / ml d'acide ascorbique 2L phosphate (≥95.0% HPLC – Sigma-Aldrich®).

Induction adipogénique

L'influence de plusieurs milieux culture adipo-inducteurs constitués ou sélectionnés dans la littérature a été étudiée et comparée sur les 8 souches cellulaires ASC, GSC D et GSC ND précédemment cultivées durant 7 jours (Table N°1). Les milieux ayant entraînés une différenciation après 7 jours ont ensuite été étudiés durant 21 jours (FIG. 1A).

A des passages précoces (P2-P3), les cellules ont étéensemencées en triplicate à une densité de 10⁴cellules / cm² dans plaque de culture standard de 24 puits (BD Biosciences). Les cellules ont ensuite été cultivées à 37°C avec 5% de CO₂ dans un incubateur, avec les différents milieux de culture cellulaire décrits ci-dessous pendant 5,7 et 21 jours. Un changement de milieu a été réalisé tous les trois jours. Afin d'assurer une culture et une induction efficace, les additifs ou hormones de croissance ont été renouvelés à chaque changement de milieu et les milieux constitués ont été filtrés à chaque changement de milieu.

Milieu control :

DMEM à forte teneur en glucose (DMEM-HG4g/L, pyruvate) contenant 10% de sérum bovin fœtal (SBF), 1% d'acides aminés non-essentiels MEM 100X, 1% Pénicilline-Streptomycine (10,000 U/mL), 0,5% Fungizone® Antimycotic et 50 µg / ml d'acide ascorbique 2L phosphate.

Milieu N°7 :

Milieu control supplémenté de **500 µM de 3-Isobutyl-1-methylxanthine** (≥99% TLC – Sigma-Aldrich®).

Milieu N°8 :

Milieu control supplémenté de **100 nM d'insuline** (4mg/mL - Gibco®).

Milieu N°1 :

DMEM à forte teneur en glucose (DMEM-HG4g/L, pyruvate) contenant 10% de sérum bovin fœtal (SBF), 1% d'acides aminés non-essentiels MEM 100X, 1% Pénicilline-Streptomycine (10,000 U/mL), 0,5% Fungizone® Antimycotic, **1 µM de Dexamethasone en poudre** (≥97% - Sigma-Aldrich®), **50 µM d'Indomethacine** (≥99% TLC – Sigma-Aldrich®), **500 µM de 3-Isobutyl-1-methylxanthine** (≥99% TLC – Sigma-Aldrich®) et **10 µg / ml d'insuline** (4mg/mL - Gibco®) (Fournier et al., 2010; Scott et al., 2011).

Milieu N°2 :

DMEM à forte teneur en glucose (DMEM-HG4g/L, pyruvate) contenant 10% de sérum bovin fœtal (SBF), 1% d'acides aminés non-essentiels MEM 100X, 1% Pénicilline-Streptomycine (10,000 U/mL), 0,5% Fungizone® Antimycotic, 1 µM de Dexamethasone en poudre, 50 µM d'Indomethacine, 0,5 mM de 3-Isobutyl-1-methylxanthine, 10 µg / ml d'insuline (4mg/mL - Gibco®) et **250 µg / ml d'acide ascorbique 2L phosphate.**

Milieu N°3 :

DMEM à forte teneur en glucose (DMEM-HG4g/L, pyruvate), 1% d'acides aminés non-essentiels MEM 100X, 1% Pénicilline-Streptomycine (10,000 U/mL), 0,5% Fungizone® Antimycotic, **500 µM de 3-Isobutyl-1-methylxanthine**, **66 nM d'insuline** (4mg/mL - Gibco®), **200pM de 3,3',5-Triiodo-L-thyronine en poudre** (≥95% HPLC - Sigma-

Aldrich®), **200pM de cortisol** et **10 µg/mL de transferrine** (Van Harmelen, Röhrig, & Hauner, 2004).

Milieu N°4 :

DMEM à forte teneur en glucose (DMEM-HG4g/L, pyruvate), 1% d'acides aminés non-essentiels MEM 100X, 1% Pénicilline-Streptomycine (10,000 U/mL), 0,5% Fungizone® Antimycotic, **100 nM de Dexamethasone en poudre**, **500 µM de 3-Isobutyl-1-methylxanthine**, **66 nM d'insuline** (4mg/mL - Gibco®), **200pM de 3,3',5-Triiodo-L-thyronine en poudre** (≥95% HPLC - Sigma-Aldrich®), **200pM de cortisol** et **100µg/ml de glitazone** (Hemmrich, Heimburg, Cierpka, Haydarlioglu, & Pallua, 2005).

Milieu N°5 :

DMEM à forte teneur en glucose (DMEM-HG4g/L, pyruvate) contenant 10% de sérum bovin foetal (SBF), 1% d'acides aminés non-essentiels MEM 100X, 1% Pénicilline-Streptomycine (10,000 U/mL), 0,5% Fungizone® Antimycotic, **50 µg / ml d'acide ascorbique 2L phosphate**, **1 mM de Dexamethasone en poudre**, **10 mM d'Indomethacine**, **500 µM de 3-Isobutyl-1-methylxanthine** et **10mg/mL d'insuline** (Choi et al., 2008).

Milieu N°6 :

DMEM à forte teneur en glucose (DMEM-HG4g/L, pyruvate) contenant **3%** de sérum bovin foetal (SBF), 1% d'acides aminés non-essentiels MEM 100X, 1% Pénicilline-Streptomycine (10,000 U/mL), 0,5% Fungizone® Antimycotic, **250 µg / ml d'acide ascorbique 2L phosphate**, **1 µM de Dexamethasone en poudre**, **250µM de 3-Isobutyl-1-methylxanthine** et **100nMd'insuline**, **200pM 3,3',5-Triiodo-L-thyronine** en poudre (≥95% HPLC - Sigma-Aldrich®) et **1µM glitazone** (Rosen & MacDougald, 2006; Vallée, Côté, & Fradette, 2009).

Viabilité cellulaire

Après 5 jours d'induction avec chacun des milieux testés, une coloration à la Calcéine AM a été réalisée afin d'évaluer la viabilité des cellules dans les différentes souches cellulaires ASC, GSC D et GSC ND. En bref, les cellules sont lavées deux fois avec du PBS 1X et incubées pendant 30 min avec une solution de travail contenant 2 pmol/l de Cell Trace Calcein Rouge-Orange AM (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) comme indiqué par le fournisseur; dans un incubateur à 37 ° C. Les cellules ont été observées et des images numériques ont été enregistrées grâce un microscope à fluorescence Zeiss équipé d'un appareil photo numérique.

Tableau N°1 Milieux utilisés pour l'induction adipocytaire *in vitro* des cellules souches adipeuses et gingivales (SBF, sérum bovin foetal; IBMX, 3-isobutyl-1-méthylxanthine; T3, 3,3',5-Triiodo-L-thyronine).

Milieu	SBF (%)	Acide Ascorbique	Dexamethasone	Insuline	IBMX	Indomethacine	Autres
CTRL	10	50 µM	-	-	-	-	-
1	10	-	1 µM	10µg/mL	500 µM	50 µM	-
2	10	250 µM	1 µM	10µg/mL	500 µM	50 µM	-
3	-	-	-	66 nM	500 µM	-	Transferrin (10µg/mL) T3 (200pM) Cortisol (100nM)
4	-	-	100 nM	66 nM	500 µM	-	Transferrin (10µg/mL) T3 (1nM) Pioglitazone (100µg/mL)
5	10	50 µM	1 mM	10 mg/mL	500 µM	10 mM	-
6	3	250 µM	1 µM	100 nM	250 µM	-	T3 (200pM) Pioglitazone (1µM)
7	10	50 µM			500 µM		
8	10	50 µM		100 nM			

Croissance et Prolifération

Pour comparer la croissance et la prolifération cellulaire des différentes populations obtenues, les cultures cellulaires ont été trypsinisées, comptées etensemencées avec le même nombre de cellules. Pour chaque souche, 2000 cellules ont étéensemencées par puits en triplicate dans une boîte 24 puits. Après 7 et 21 jours d'induction, les cellules ont été décollées et l'ARN a été extrait ; les quantités ou concentrations d'ARN ainsi obtenues ont pu être comparées.

Histologie

Pour chaque souche, 20 000 cellules ont étéensemencées par puits en triplicate dans une boîte 12 puits. Après 7 et 21 jours d'induction adipogénique, une coloration à l'Oil Red O a permis de mettre en évidence la présence ou non de vacuoles lipidiques. Les échantillons ont d'abord été rincées avec du PBS, fixées avec du formaldéhyde à 4% - 5% de saccharose pendant 10 minutes et colorés. Les noyaux ont été contre-colorés à l'hémalum. Les résultats ont été observés et capturés en utilisant un microscope optique avec capture d'images numériques (Zeiss). En outre, un dosage de l'Oil Red O (Absorbance) a été réalisé. Brièvement, une fois

les images enregistrées, 400 µl d'isopropanol ont été ajoutés et homogénéisés dans chaque puits de la plaque 12 puits. Ensuite, 100µl de surnageant ont été prélevés et transférés trois fois pour chaque condition dans un puits de 96 puits pour une lecture en triplicate sous spectromètre à 540nm.

Immuno-Histochimie

Pour chaque souche, 2000 cellules ont étéensemencées sur des lamelles de verre ; en triplicate dans une boîte 24 puits. A 90% de confluence, les cellules ont été fixées en utilisant une solution de PBS 1X contenant 4% de paraformaldéhyde - 5% de saccharose durant 15 minutes à 4°C ; puis perméabilisées en utilisant 0,5% de Triton X-100. Pour bloquer une éventuelle coloration non spécifique, les cellules ont été incubées pendant 20 minutes avec du PBS 1X contenant 1% de BSA / 1 % de la glycine à 37 ° C. Puis les cellules ont été mises au contact d'un mélange GFP-phalloïdin (1/200) et DAPI (1/4000) à 37 ° C pendant 20 minutes et rincées trois fois. Les colorations ont été observées en utilisant un microscope à fluorescence Zeiss équipé d'un appareil photo numérique.

Analyse de l'expression des ARNm par qRT-PCR

La caractérisation et la quantification de la différenciation adipogénique ont été réalisées par l'étude de l'expression des ARNm de certains gènes spécifiques par qRT-PCR (PCR quantitative en temps réel) à 7 et 21 jours (voir le Tableau N°2). Les ARN ont été extraits des cultures cellulaires en utilisant une solution Tri Reagent (Molecular Research Center) selon le protocole du fabricant. La concentration des ARN ainsi que la pureté ont été évaluées par spectrophotométrie (Nanodrop, Thermo Scientific, Wilmington, MA, USA). Seuls les échantillons avec un rapport DO260/280 au-dessus de 1,8 ont été utilisés pour cette étude. L'ADNc a été rétro transcrit en utilisant le kit Superscript II (Invitrogen, France) selon les instructions du fabricant. Toutes les amorces ont été conçues et analysées par le logiciel BLASTn (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Pour les réactions de qRT-PCR, les produits RT ont été dilués et mélangés avec 7,5µl de KapaFast-SYBR2X (Kapa Biosystems, Wilmington, MA, USA), 3.375 pmoles de primers, pour un volume final de 15µl. L'amplification par PCR en temps réel a été effectuée sur le système Bio-Rad CFX96 (Bio-Rad Laboratories) en utilisant le programme suivant: un cycle à 94°C pendant 3 min, 35 cycles à 95°C pendant 5 s, et la réaction achevée après lecture de plaque et analyse de la melting curve de 65°C à 95°C, 5 s pour chaque 0,5°C. Les gènes SDHA (succinate deshydrogenase complex subunit A flavoprotein) et UBC (ubiquitine C) ont été utilisés en

tant que gènes de référence. Des ARN non rétro-transcrits et de l'eau stérile ont été utilisés comme témoins négatifs. Les réactions de PCR ont été réalisées en triplicate pour chaque échantillon. Les données ont été analysées sur la base de la méthode de $2\Delta\Delta C_t$ comparative (CFX Software Manager Version 2.1, Bio-Rad Laboratories). Pour les séquences d'amorces, voir le Tableau N°2.

Tableau N°2- Séquences des primers utilisés

Genes	Sequences (5'>3')	Taille d'amplicons (bp)	Numéro d'accesion
<i>SDHA</i>	F:AGC AAG CTC TAT GGA GAC CT R:TAA TCG TAC TCA TCA ATC CG	200	NM_004168.3
<i>UBC</i>	F:GTG GCA CAG CTA GTT CCG T R:CTT CAC GAA GAT CTG CAT TGT CA	98	NM_021009
<i>FABP4</i>	F: TGG-GCC-AGG-AAT-TTG-ACG-AA R: GCG-AAC-TTC-AGT-CCA-GGT-CA	232	NM_001442.2
<i>PPARγ2</i>	F: GCG-ATT-CCT-TCA-CTG-ATA-C R: CTT-CCA-TTA-CGG-AGA-GAT-CC	123	NM_015869.4
<i>LPLase</i>	F: CAG-GAT-GTG-GCC-CGG-TTT-AT R: GCT-GGA-TCG-AGG-CCA-GTA-AT	158	NM_000237.2
<i>APN</i>	F: AGGAGATCCAGGTCTTATTGGT R: AGTGGAGCCATCATAGTGGT	238	NM_001177800.1
<i>RUNX2</i>	F: CCG-GAA-TGC-CTC-TGC-TGT-TA R: TGT-CTG-TGC-CTT-CTG-GGT-TC	192	NM_001024630.3
<i>SOX9</i>	F: CTGTAGGCGATCTGTTGGGG R:AGCGAACGCACATCAAGAC	85	NM_000346.3
<i>UCP1</i>	F : GTGTGCCCAACTGTGCAATG R : CCAGGATCCAAGTCGCAAGA	1063	XM_005263206.1
<i>FN</i>	F :AGC-AAG-CCC-GGT-TGT-TAT-GA R: CCC-ACT-CGG-TAA-GTG-TTC-CC	185	NM_212482.2

Analyse statistique

L'analyse statistique a été réalisée en utilisant le test de Bonferroni à l'aide du logiciel PrismGraphPad5 (GraphPad Software Inc, La Jolla, CA, USA). Les résultats sont présentés sous forme de moyenne \pm écart-type (SD). Les résultats ont été considérés comme significatifs avec une valeur de $p < 0,05$. (Sur les graphs *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$).

RESULTATS

L'influence de 7 milieux de culture inducteurs de l'adipogénèse a été étudiée après 7 jours d'induction dans les 8 souches cellulaires; et comparée au milieu de prolifération cellulaire appelé « Control ». Sous l'influence des différentes conditions inductrices, la différenciation adipocytaire a pu être mise en évidence en culture en monocouche par un changement de phénotype avec l'apparition de vacuoles lipidiques se répartissant dans le cytoplasme. Ces vacuoles ont été visibles en microscopie optique grâce à une coloration spécifique à l'Oil Red O. En outre, la viabilité cellulaire et la prolifération cellulaire ont également été observées (FIG. 1A). Des différences significatives ont été observées entre les différents milieux d'induction; seuls les milieux N°1, N°2 et N°6 entraînaient une différenciation des cellules. Ainsi pour ces 3 milieux, l'induction a été prolongée durant 21 jours et l'expression génique a été évaluée par PCR quantitative aux jours 7 et 21 afin de caractériser la différenciation obtenue (FIG. 1A).

Viabilité et prolifération cellulaire

Après 5 jours, le test de viabilité cellulaire a mis en évidence la présence de cellules vivantes dans toutes les conditions d'induction dans les 8 souches testées. Seuls les résultats observés sur une des souches ASC sont présentés dans la Figure N°1 (FIG. 1B-J), où une fluorescence de la Calcéine AM a été observée dans les milieux Control, M1, M2, M3, M4, M5, M6, M7 et M8. Néanmoins, une densité cellulaire moins importante a été notée dans les milieux M3, M5 et M7 (FIG. 1E, G et I) ; ce qui a été confirmé par une faible prolifération cellulaire dans les milieux M3, M4, M5 et M7 (FIG. 1K). En effet, la quantité d'ADN extraite des cellules est significativement inférieure, de plus de moitié, comparé au milieu control ($p < 0,001$) ce qui signe un nombre de cellules moindre.

Comparaison des milieux Contrôle, N°7 et N°8

Le milieu Control est le milieu classiquement utilisé pour la prolifération des fibroblastes gingivaux. Les milieux 7 et 8 sont donc des milieux de prolifération supplémentés soit en isobutyl-méthyl-xantine (IBMX) soit en insuline. Ces derniers nous permettent d'analyser le rôle exact des deux composés supplémentaires dans la culture cellulaire et la différenciation. Après 7 jours de culture, quelle que soit la souche testée avec le milieu de contrôle, les cellules ont conservées leur morphologie fibroblastique et n'ont pas formé de vacuoles lipidiques (FIG. 2A-C).

L'ajout d'IBMX au milieu de contrôle appelé milieu N°7 diminue la densité cellulaire et le nombre de cellules (FIG. 1K) ; les souches GSC D ont perdu peu à peu leur morphologie fusiforme avec l'apparition d'une constriction du cytoplasme des cellules (FIG. 2F). Des petites vacuoles lipidiques semblent observables pour les souches ASC et GSC D (FIG. 2E et F). Néanmoins concernant les souches issues de la gencive, les mesures d'absorbance de l'Oil Red O sont significativement plus faibles que pour le milieu de contrôle (FIG. 2N et O) ; alors qu'aucune différence significative n'est observée pour les souches ASC (FIG. 2M). L'IBMX semble donc avoir une influence négative sur la prolifération et n'est pas suffisant pour induire une adipodifférenciation (Fig1K).

Concernant le milieu N°8, l'ajout de d'insuline à 100 nM n'a semblé ni modifier la morphologie fibroblastique, ni former des vacuoles lipidiques (FIG. 2I-K) ; et n'a entraîné aucune différence d'absorbance par rapport au milieu de contrôle (FIG. 2L-O). Néanmoins, l'insuline semble augmenter la prolifération cellulaire après 7 jours (FIG. 1K), comme cela a déjà été montré.

Comparaison des milieux N°3, N°4 et N°5

Après 7 jours d'induction, les milieux N°3 et N°4 ont entraîné un changement de la morphologie des cellules pour les souches ASC et GSC D (FIG. 3A-F). Pour les cellules GSC ND, le milieu N°3 a entraîné la mort des certaines cellules qui sont devenues rondes et anucléées. Les milieux N°3 et N°4 ont montré une valeur d'absorbance ainsi qu'une quantité d'ARN extraite très faibles. Quant au milieu N°5, les cellules ont été retrouvées mortes après 1 semaine d'induction, seules très peu de cellules sont arrivées à survivre (FIG. 3G, H, I) ; ce qui a été confirmé par une quantité d'ARN obtenue significativement plus faible ($p < 0,01$) dans les souches GSC D (FIG. 3K).

Comparaison des milieux N°1 et de Contrôle

Le milieu N°1 est le milieu classiquement retrouvé dans la littérature pour l'induction adipogénique des fibroblastes gingivaux. Dans notre étude, ce milieu a bien entraîné la formation de vacuoles lipidiques dans toutes les souches ASC, GSC D et GSC ND après 7 et 21 jours d'induction (FIG 4. A-I). Néanmoins les souches GSC ND ont très peu différencié voire pas du tout pour certaines (FIG 4. F et I). Dans toutes les conditions, les cellules ont conservé leur morphologie fibroblastique en épingle ; hormis les cellules GSC ND ayant formées des vacuoles à J7 qui présentaient une forme plus large et étendue. Après 7 jours d'induction avec le milieu N°1, les mesures d'absorbance de la coloration à l'Oil Red O ont

montré une augmentation significative de la différenciation dans toutes les souches cellulaires ; comparé au milieu de contrôle ($p < 0,05$ pour les souches ASC; $p < 0,01$ pour les souches GSC ND; $p < 0,001$ pour les souches GSC D) (FIG. 4J). Concernant les souches GSC ND, les cellules qui ont formé des vacuoles lipidiques étaient peu nombreuses et dans des zones de faible densité cellulaire. Après 21 jours d'induction, seule une augmentation significative est visible dans les souches ASC et GSC D ($p < 0,001$ pour les souches ASC et GSC D) (FIG. 4K), comparé au milieu de contrôle. Néanmoins, une augmentation significative ($p < 0,001$) du nombre de vacuoles lipidiques a été observée dans toutes les souches au 21^{ème} jour comparé au 7^{ème} (FIG. 4L). Pour finir, la quantité d'ARN cellulaire obtenue après 7 et 21 jours d'induction avec le milieu N°1 n'est pas significativement différente de celle obtenue avec le milieu de prolifération pour les souches gingivales (FIG. 4M).

Comparaison des milieux N°2 et N°1

Le milieu N°2, milieu N°1 enrichi en acide ascorbique 2L phosphate, a lui aussi entraîné la formation de vacuoles lipidiques dans toutes les souches ASC et GSC après 7 et 21 jours d'induction (FIG 5. A-I). Après 7 jours d'induction, les mesures d'absorbance de la coloration à l'Oil Red O ont montré une augmentation significative de la différenciation avec le milieu M2 ($p < 0,05$) comparé au milieu N°1 uniquement dans les souches GSC D (FIG. 5J). Après 21 jours d'induction, aucune différence d'absorbance n'est visible entre les milieux N°1 et N°2 dans les différentes souches (FIG. 5K) ; même si les photographies microscopiques ont semblé montrer une plus importante quantité de vacuoles lipidiques. Cependant, après 21 jours on observe une augmentation significative ($p < 0,001$) de vacuoles lipidiques dans les souches ASC et GSC D par rapport au 7^{ème} jour (FIG. 5L). Pour finir, après 7 ou 21 jours d'induction avec le milieu N°2, la quantité d'ARN cellulaire obtenue n'est pas significativement différente que celle obtenue avec le milieu de prolifération pour les souches gingivales (FIG. 5M). La vitamine n'influence donc pas la prolifération cellulaire mais a un effet positif sur l'adipodifférenciation.

FIGURE N°1

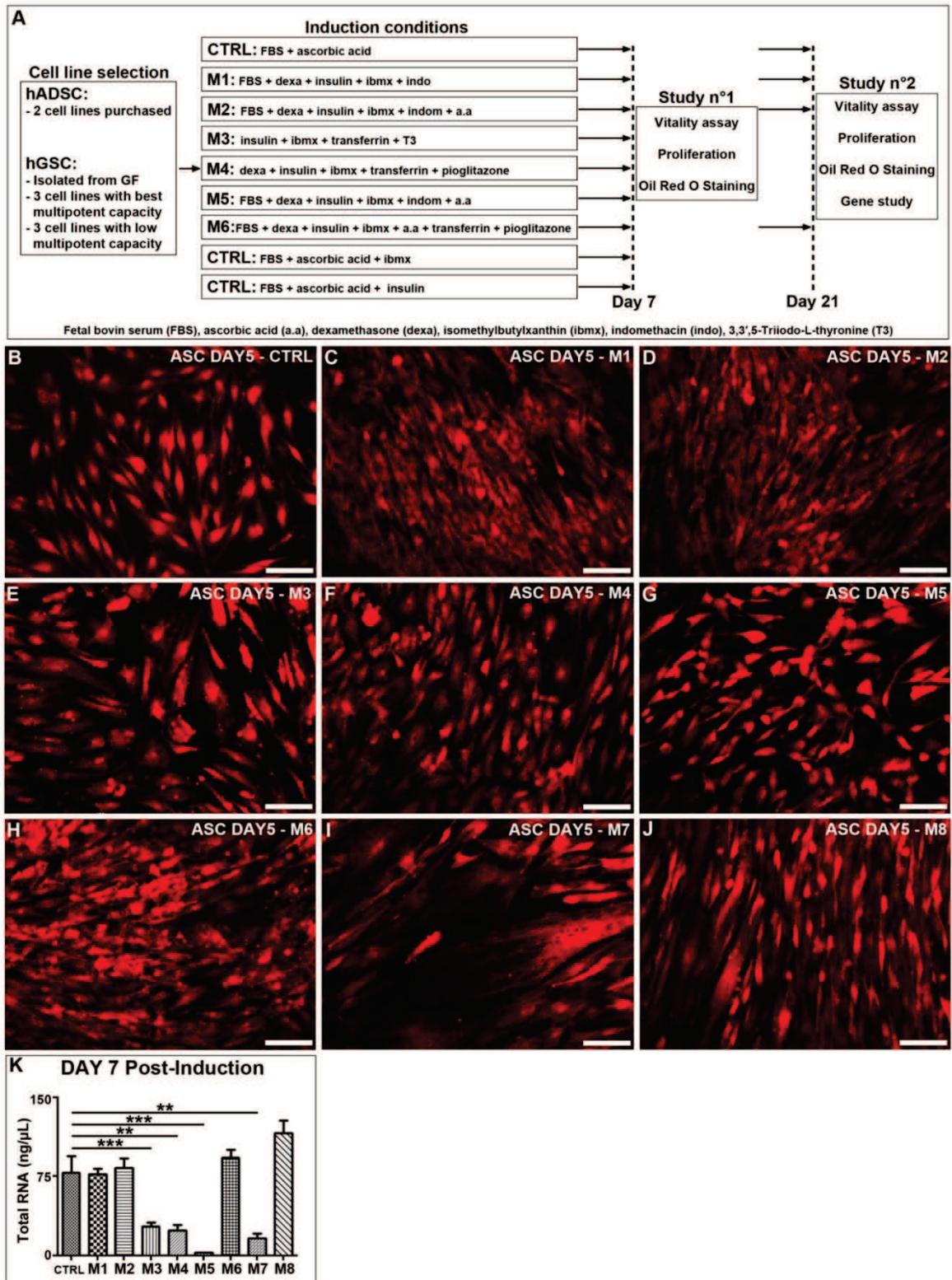


Figure 1. A). Représentation schématique du protocole et des méthodes utilisées pour la réalisation de ce travail. B-J). Marquage de la viabilité cellulaire à la Calcéine-AM après 5 jours d'induction dans les différents milieux testés (CTRL, M1, M2, M3, M4, M5, M6, M7 et M8) sur une souche ASC. K). Comparaison de la quantité d'ARN total moyenne extraite (en ng/μl) dans toutes les souches ASC et GSC en fonction du milieu d'induction utilisé. Echelle = 100μm.

FIGURE N°2

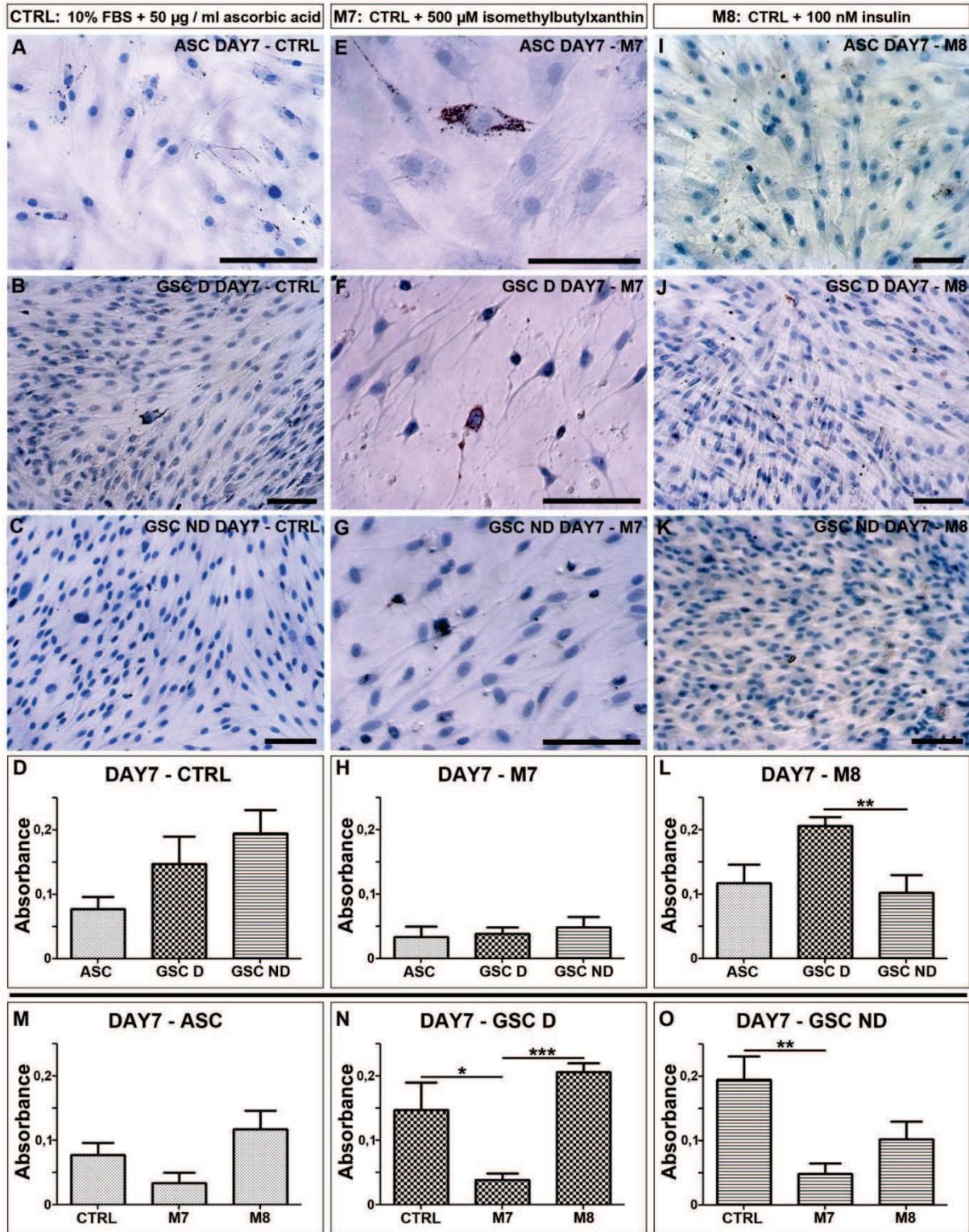


Figure 2. Comparaison des milieux Control, N°7 et N°8. A, B, C, E, F, G, I, J et K). Photographies microscopiques de la coloration Oil Red O pour les souches ASC, GSC D et GSC ND après 7 jours d'induction. D, H et L). Mesure des valeurs moyennes d'absorbance obtenues après 7 jours d'induction pour les souches ASC, GSC D et GSC ND. M, N et O). Comparaison des mesures des valeurs moyennes d'absorbance de l'Oil Red O obtenues pour les 3 milieux pour chaque souche ASC, GSC D et GSC ND. Echelle = 100µm.

FIGURE N°3

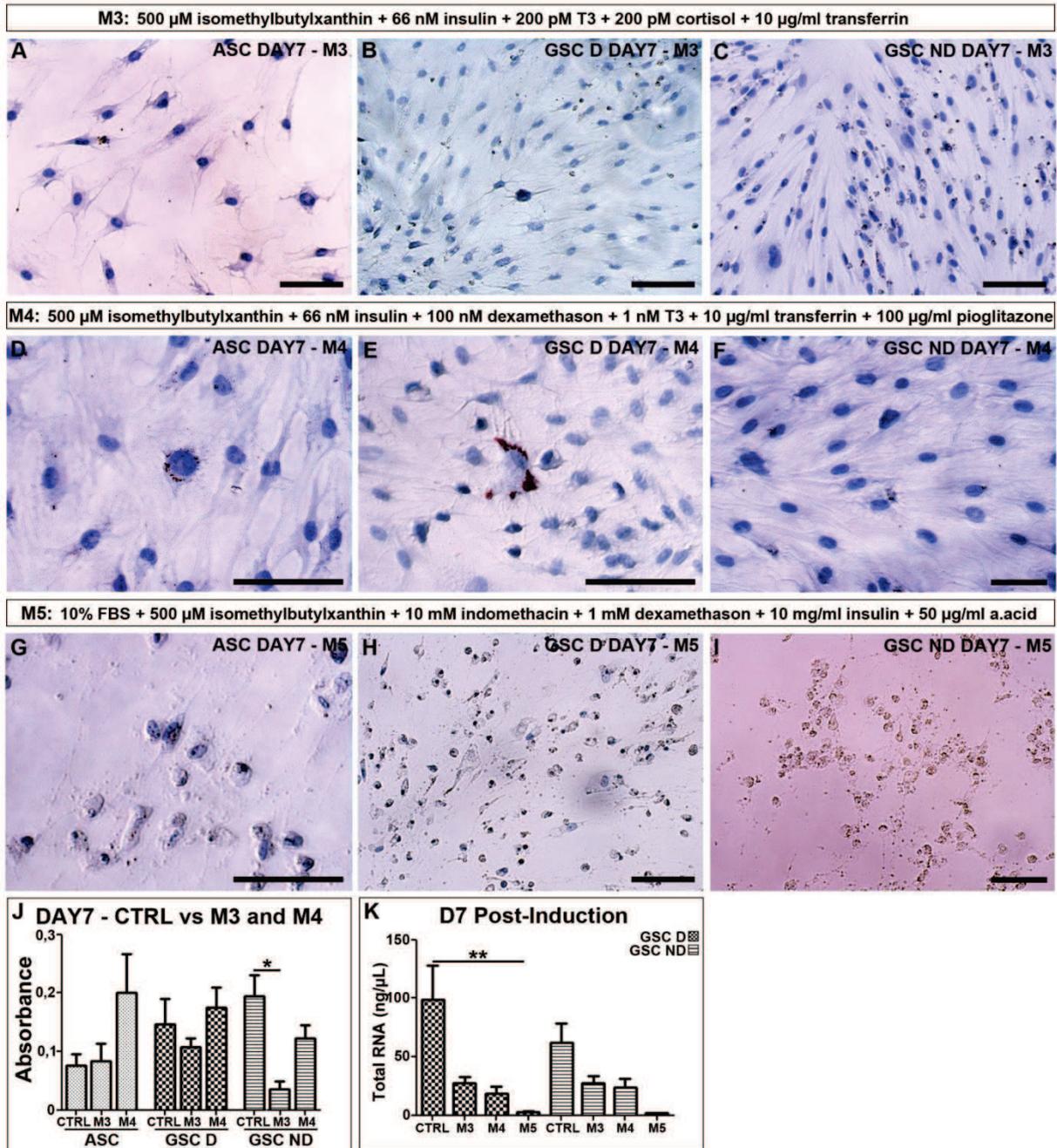


Figure 3. Comparaison des milieux N°3, N°4 et N°5. A-I). Photographies microscopiques de la coloration Oil Red O pour les souches ASC, GSC D et GSC ND après 7 jours d'induction. J). Comparaison des mesures des valeurs moyennes d'absorbance de l'Oil Red O obtenues pour les 3 milieux pour chaque souche ASC, GSC D et GSC ND. K). Comparaison de la quantité d'ARN total moyenne extraite (en ng/ μ l) dans toutes les souches ASC et GSC en fonction du milieu d'induction utilisé. Echelle = 100 μ m.

Comparaison des milieux N°6, N°2 et N°1

Le milieu N°6, milieu enrichi en glitazone et en T3, est utilisé pour la différenciation des cellules du tissu adipeux. Il a permis la formation de vacuoles lipidiques pour toutes les souches après 7 et 21 jours (FIG. 6A-I). Après 21 jours, une différence d'absorbance a été visible ($p < 0,001$) entre le milieu N°6 et les milieux N°1 et N°2 pour les souches ASC (FIG. 6J et K) comparé à J7. De plus, la différenciation adipocytaire a été plus importante dans les souches GSC D par rapport à celles GSC ND (FIG. 6K). Après 21 jours d'induction, une augmentation significative ($p < 0,001$) du nombre de vacuoles lipidiques dans les souches ASC et GSC D a été observée par rapport au 7^{ème} jour ; ainsi que pour GSC ND ($p < 0,05$) (FIG. 6L). Pour finir, après 7 ou 21 jours d'induction avec le milieu N°6, la quantité d'ARN cellulaire obtenue n'est pas significativement différente que celle obtenue avec le milieu control de prolifération pour les souches gingivales (FIG. 6M).

FIGURE N°4

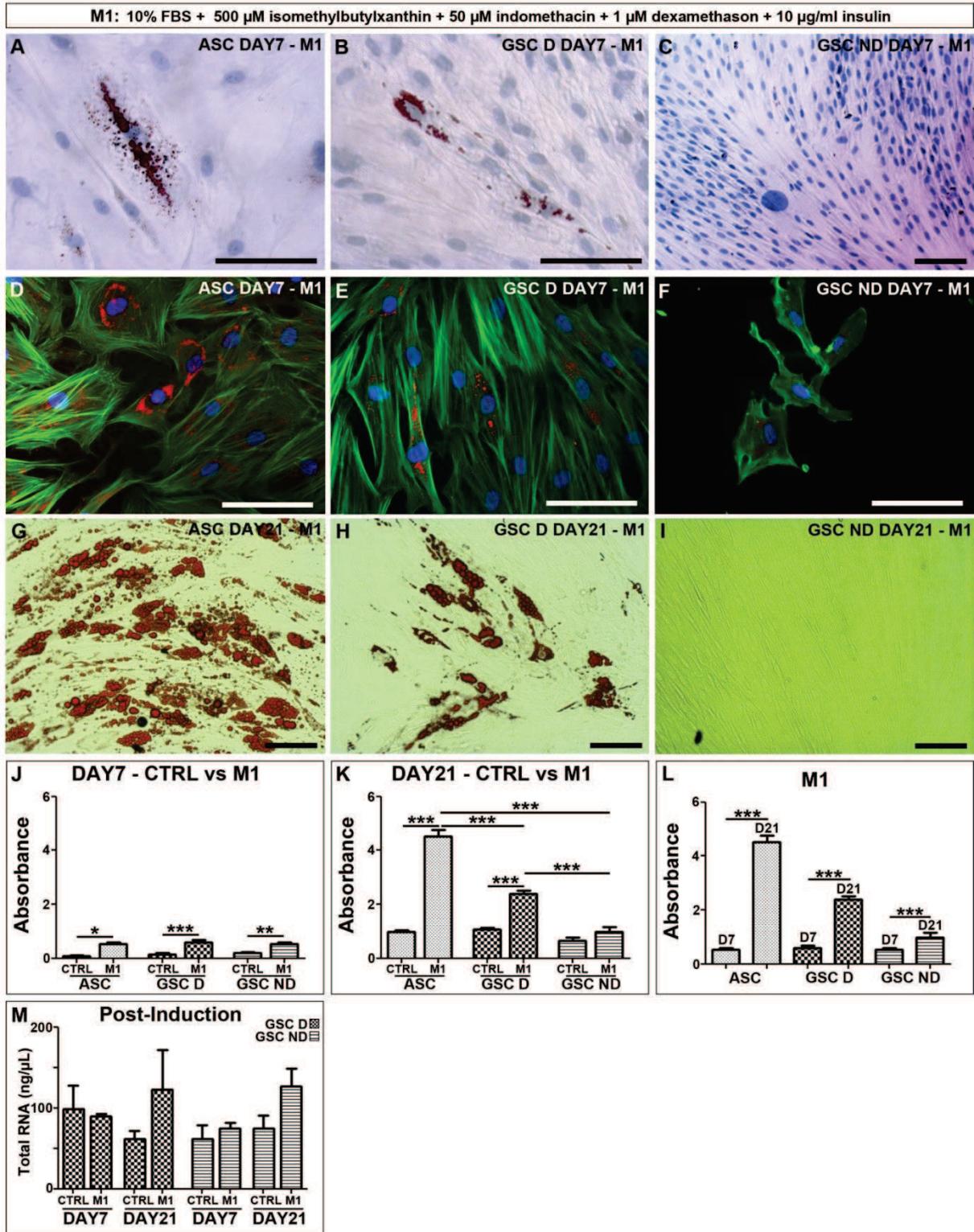


Figure 4. Photographies microscopiques de la coloration Oil Red O pour les souches ASC, GSC D et GSC ND après 7 (A-C) et 21 jours (G-I) d'induction. D-F). Immuno-histologie de la coloration Oil Red O associée à la phalloïdine pour les souches ASC, GSC D et GSC ND après 7 jours d'induction. J-L). Comparaison des mesures des valeurs moyennes d'absorbance de l'Oil Red O obtenues pour les 3 milieux pour chaque souche ASC, GSC D et GSC ND avec le milieu contrôle. M). Comparaison de la quantité d'ARN total moyenne extraite (en ng/ μ L) dans toutes les souches GSC D et GSC ND en fonction du milieu d'induction utilisé. Echelle = 100 μ m.

FIGURE N°5

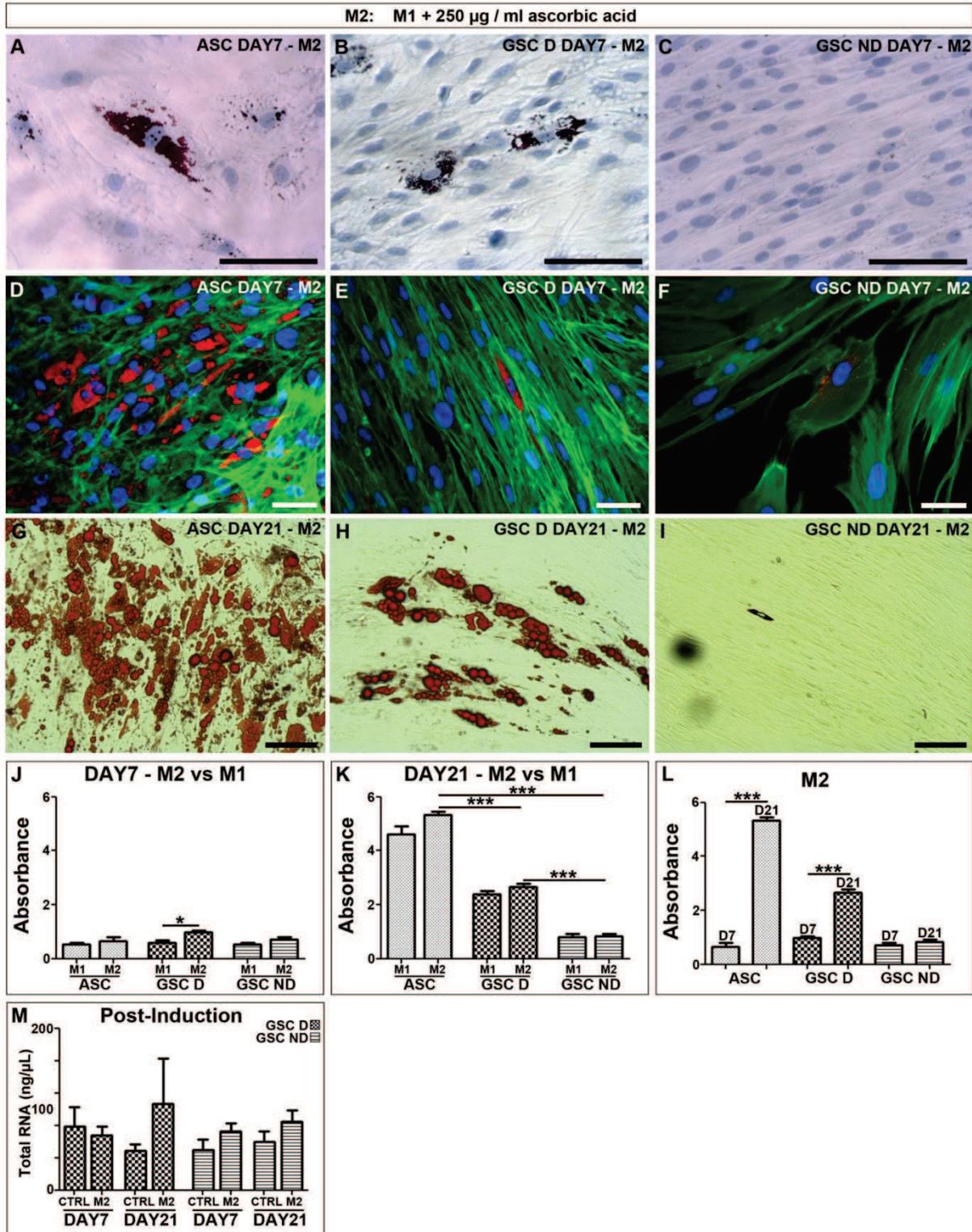


Figure 5. Photographies microscopiques de la coloration Oil Red O pour les souches ASC, GSC D et GSC ND après 7 (A,B,C) et 21 jours (G,H,I) d'induction. D,E,F). Immuno-histologie de la coloration Oil Red O associé à la phalloïdine pour les souches ASC, GSC D et GSC ND après 7 jours d'induction. J,K,L). Comparaison des mesures des valeurs moyennes d'absorbance de l'Oil Red O obtenues pour les 3 milieux pour chaque souche ASC, GSC D et GSC ND avec le milieu N°1. M). Comparaison de la quantité d'ARN total moyenne extraite (en ng/µl) dans toutes les souches GSC D et GSC ND en fonction du milieu d'induction utilisé. Echelle = 100µm.

FIGURE N°6

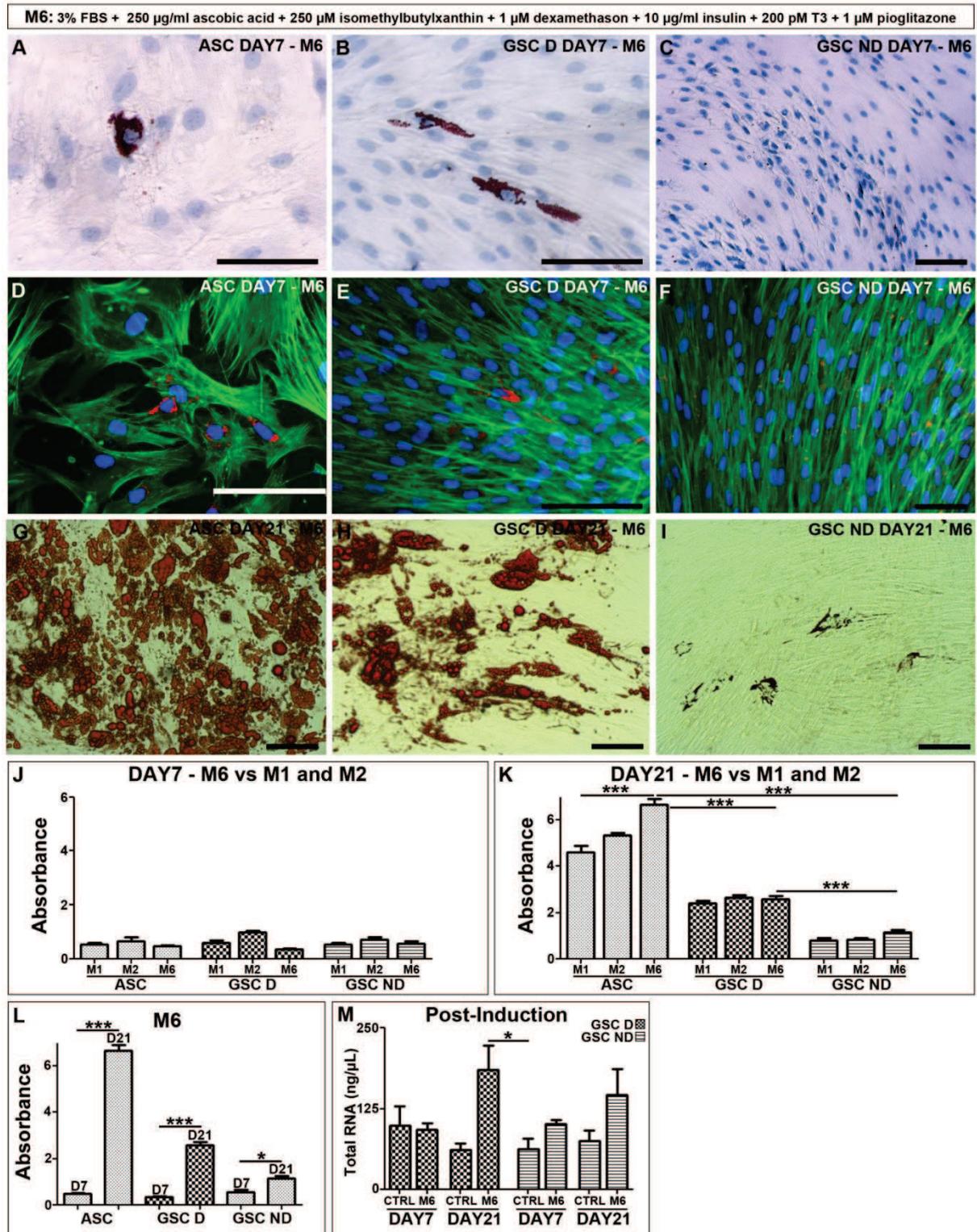


Figure 6. Photographies microscopiques de la coloration Oil Red O pour les souches ASC, GSC D et GSC ND après 7 (A,B,C) et 21 jours (G,H,I) d'induction. D,E,F). Immuno-histologie de la coloration Oil Red O associé à la phalloïdine pour les souches ASC, GSC D et GSC ND après 7 jours d'induction. J,K,L). Comparaison des mesures des valeurs moyennes d'absorbance de l'Oil Red O obtenues pour les 3 milieux pour chaque souche ASC, GSC D et GSC ND avec les milieux N°1 et N°2. M). Comparaison de la quantité d'ARN total moyenne extraite (en ng/µl) dans toutes les souches GSC D et GSC ND en fonction du milieu d'induction utilisé. Echelle = 100µm.

Analyse par RT-PCR du phénotype adipogénique

Afin d'évaluer plus précisément l'état de cellules souches mésenchymateuses après différenciation, nous avons étudié l'expression de plusieurs gènes maîtres liés à l'adipodifférenciation et l'ostéodifférenciation. L'expression génique a été évaluée par PCR quantitative aux jours 7 et 21 pour les milieux ayant différencié N°1, N°2 et N°6 et le milieu de prolifération (control). Le gène FABP4 (Fatty acid binding protein 4) est exprimé lors du transport des lipides dans le cytoplasme des adipocytes. Le gène de la lipoprotéine lipase (LPL) est considéré comme un marqueur précoce de la différenciation adipocytaire. Le gène de l'adiponectine (APN) est exprimé au cours des étapes tardives de différenciation. Quant au gène PPAR γ , son expression est induite au début de la différenciation adipocytaire et augmente au cours de celle-ci, ce gène est considéré comme le gène maître de l'adipogenèse.

Après 7 jours d'induction, l'analyse des gènes de l'adipodifférenciation tels que FABP4, PPAR γ , LPLase et APN n'a montré aucune différence d'expression entre les différentes souches à l'exception du gène APN pour les souches GSC D. Après 21 jours d'induction, les gènes étaient plus exprimés dans les souches ASC comparées aux souches gingivales.

Souches ASC

A J21, FABP4, PPAR γ et LPLase ont été significativement augmentés pour les milieux N°1 et N°2 comparés au milieu de contrôle pour les souches ASC; tandis que l'expression du gène APN n'a été augmentée que dans le milieu N°1. Après induction avec les milieux N°1 et N°2, l'expression de PPAR γ a été augmentée de J7 à J21 (FIG.7 B, F et J et FIG.8 B).

Souches GSC D

Après 7 jours, seul APN a été augmenté de manière significative dans les milieux N°2 et N°6 par rapport au contrôle. A J21, FABP4, PPAR γ ont été augmentés significativement pour les milieux N°2 et N°6 comparés au milieu de contrôle pour les souches GSC D; alors que l'expression de la LPLase et APN n'ont été augmentées que pour le milieu N°2. Après induction avec le milieu N°2, les gènes PPAR γ et LPLase ont été up-régulés de J7 à J21 (FIG.7 C, G et Ket FIG.8 C).

Souches GSC ND

A J21, l'expression de FABP4 a été augmentée significativement pour le milieu N°6 par rapport au milieu de contrôle pour les souches GSC ND; alors que les expressions de PPAR, LPLase et APN n'ont été augmentées que pour les milieux N°1 et N°2. Le gène FABP4 a été

up-régulé entre J7 et J21 après induction avec le milieu N°6 alors que LPLase est up régulé après induction avec les milieux N°1 et N°2 (FIG.7 D, H et Let FIG.8 D).

Pour finir, l'analyse du gène UCP1 a montré que celui-ci n'était exprimé que dans les souches GSC D, après induction avec le milieu N°6 à J7 et avec les milieux N°2 et N°6 à J21. Après induction avec le milieu N°6, UCP1 est up-régulé entre J7 et J21 (FIG.8 M).

Dans un second temps, l'analyse des gènes maîtres de l'ostéodifférenciation RUNX2 et de la différenciation cartilagineuse SOX9 a été réalisée à J7 et J21.

Souches ASC

A J7, le gène RUNX2 a été diminué de manière significative après induction avec les milieux N°1 et N°6 comparé au milieu de contrôle. Aucune différence n'a été observée à J21 pour RUNX2 et SOX9 à J7 et J21 (FIG.8 F et J).

Souches GSC D et GSC ND

Aucune différence n'a été observée dans les différentes conditions pour RUNX2. Le gène SOX9, a été exprimé de manière plus importante dans les souches GSC D à J7 dans les milieux N°1 et N°2 et à J21 dans les milieux N°1 et N°6 ; avec une up-régulation dans le milieu N°1 de J7 à J21. Le gène SOX9 est augmenté dans les souches GSC ND à J21 pour le milieu N°1 (FIG.8 G, K, H et L). Pour finir, aucune différence n'a été observée pour le gène FN dans les différentes conditions (FIG.8 N).

Bilan des résultats

Pour toutes les souches cellulaires, le milieu contrôle de prolifération cellulaire n'a pas permis la formation de vacuoles lipidiques. Les milieux N°7 et N°8, milieux de contrôle supplémentés, n'ont pas permis non plus la formation de vacuoles lipidiques après 7 jours. L'isobutyl-méthyl-xanthine a entraîné un changement de la morphologie des cellules ; tandis que l'insuline a semblé augmenter la prolifération cellulaire après 7 jours. Les milieux N°3, N°4 et N°5 ont entraîné un changement de morphologie, diminution importante du nombre de cellules ; voire la mort des cellules dans certains cas. Seuls les milieux N°1, N°2 et N°6 ont entraîné une différenciation des cellules sans toutefois modifier la prolifération. L'induction des milieux N°2 et N°6 sur les différentes souches gingivales et adipeuses, a induit une meilleure différenciation adipogénique que le milieu N°1. Néanmoins, le milieu N°6 a été celui qui a semblé induire la meilleure adipodifférenciation des cellules souches gingivales après 21 jours.

FIGURE N°7

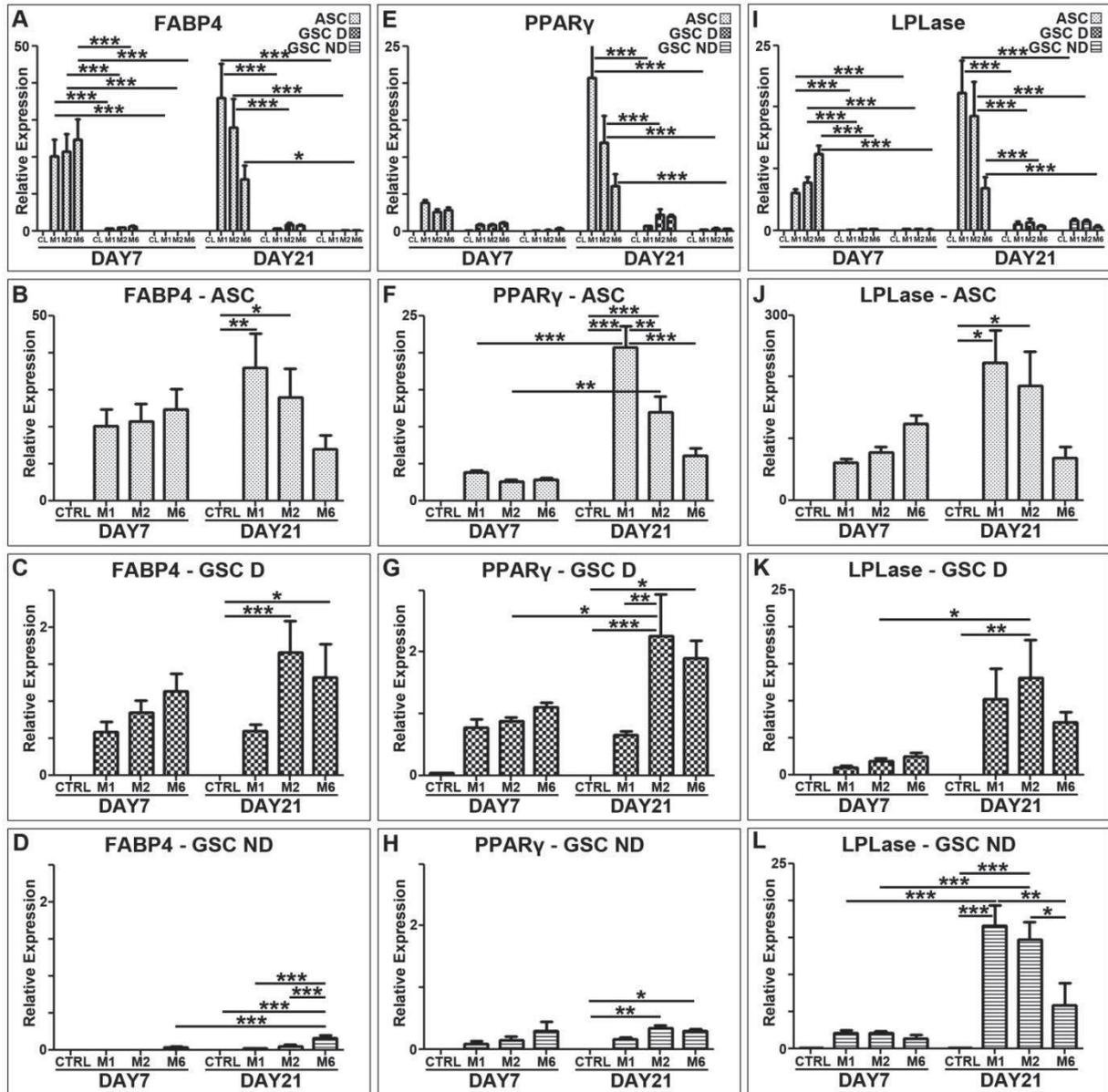


Figure 7. Analyse des gènes maîtres de l'adipodifférenciation FABP4, PPAR γ et LPLase. A, E et I) Comparaison de l'expression des gènes FABP4, PPAR γ et LPLase après induction avec les milieux N°1, N°2 et N°6 pour toutes les souches cellulaires à J7 et J21. B, F et J) Comparaison de l'expression des gènes FABP4, PPAR γ et LPLase après induction avec les milieux N°1, N°2 et N°6 pour les souches cellulaires ASC à J7 et J21. C, G et K) Comparaison de l'expression des gènes FABP4, PPAR γ et LPLase après induction avec les milieux N°1, N°2 et N°6 pour les souches cellulaires GSC D à J7 et J21. D, H et L) Comparaison de l'expression des gènes FABP4, PPAR γ et LPLase après induction avec les milieux N°1, N°2 et N°6 pour les souches cellulaires GSC ND à J7 et J21.

FIGURE N°8

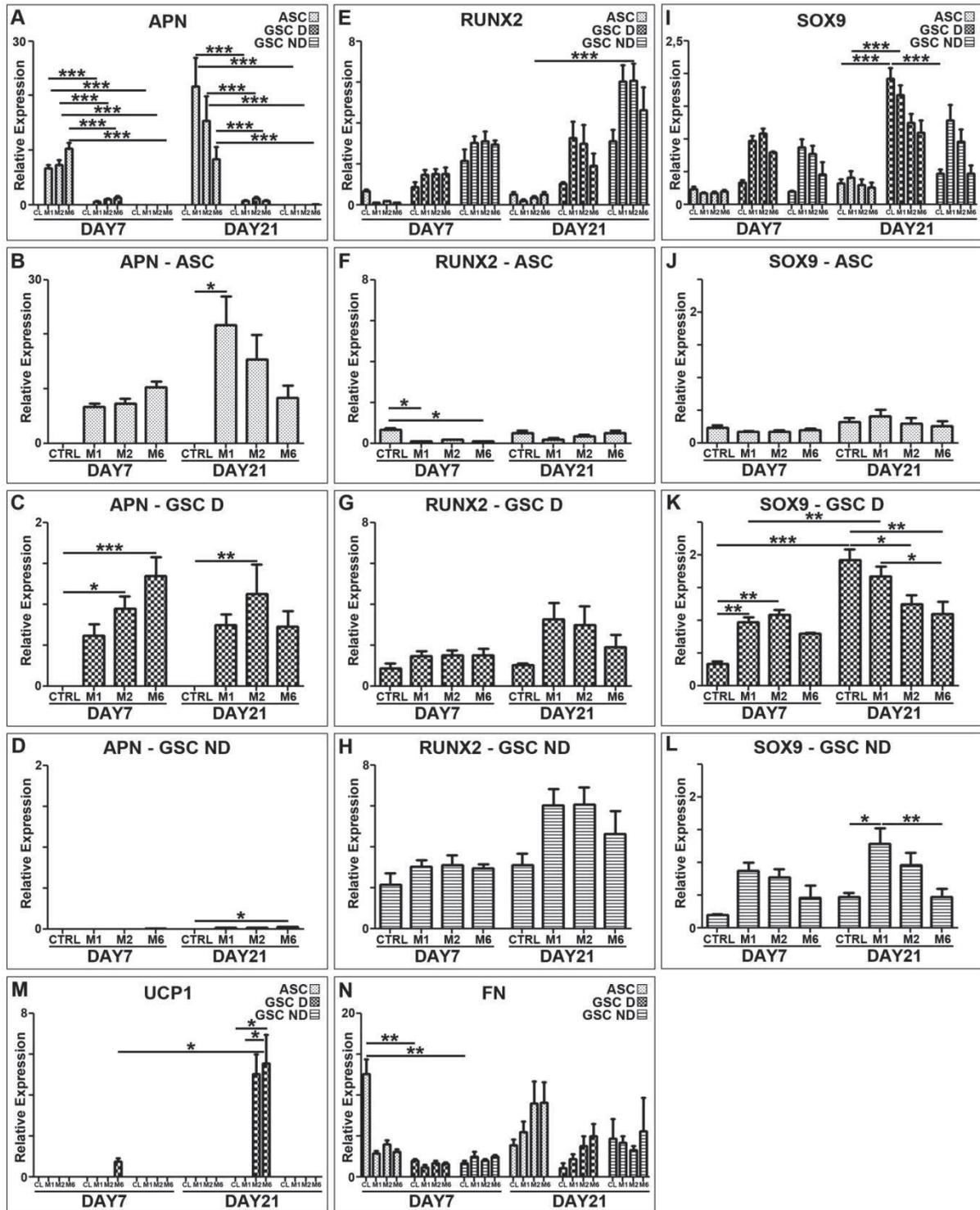


Figure 8. A, E, I, M et N) Comparaison de l'expression des gènes APN, RUNX2, SOX9, UCP1 et FN après induction avec les milieux N°1, N°2 et N°6 pour toutes les souches cellulaires à J7 et J21. B, F et J) Comparaison de l'expression des gènes APN, RUNX2 et SOX9 après induction avec les milieux N°1, N°2 et N°6 pour les souches cellulaires ASC à J7 et J21. C, G et K) Comparaison de l'expression des gènes APN, RUNX2 et SOX9 après induction avec les milieux N°1, N°2 et N°6 pour les souches cellulaires GSC D à J7 et J21. D, H et L) Comparaison de l'expression des gènes APN, RUNX2 et SOX9 après induction avec les milieux N°1, N°2 et N°6 pour les souches cellulaires GSC ND à J7 et J21.

DISCUSSION

Les objectifs de ce travail ont été de comparer les effets *in vitro* de plusieurs milieux retrouvés dans la littérature sur les cellules souches dérivées gingivales afin de comprendre et évaluer le rôle des différents composants pro-adipogéniques. Dans la présente étude, l'induction adipocytaire de plusieurs lignées de cellules souches dérivées de la gencive (CSG) ou adipeuses (ASC) a été réalisée à l'aide plusieurs milieux de culture et comparée avec un « milieu contrôle » dépourvu d'additifs. Ce milieu de contrôle composé de 10% de FBS et 50 µg/ml d'acide ascorbique, représente le milieu de référence utilisé lors de l'expansion et la prolifération des cellules dans notre laboratoire. La viabilité, la prolifération, la morphologie, l'accumulation de lipides dans les cellules différenciées ou encore l'expression de plusieurs gènes maîtres de la différenciation adipocytaire ont été étudiées après 7 ou 21 jours.

Le milieu couramment utilisé dans la littérature pour stimuler la différenciation adipocytaire des préadipocytes ou encore des cellules souches mésenchymateuses est une combinaison de sérum, de dexaméthasone, de 3-isobutyl-1-méthylxanthine (IBMX), d'indométhacine ou encore d'insuline (Scott et al., 2011). Le principal objectif de ce travail a été de comprendre les effets de ces additifs les plus communs, ainsi que ceux présents dans les nouveaux milieux sans sérum à base d'hormones (glitazone ou T3) proposés dans le cadre de la différenciation des cellules souches adipeuses. Le milieu décrit par Vallée et col, composé de T3 et de rosiglitazone a été celui qui a induit la meilleure différenciation adipocytaire des cellules souches testées après 21 jours.

Dans cette étude, la différenciation adipocytaire s'est développée plus rapidement pour les cellules souches adipeuses comparé aux cellules souches gingivales ; en raison de la présence de préadipocytes déjà disponible. Ce phénomène a déjà été décrit pour d'autres types de cellules souches mésenchymateuses (Ghoniem, Yahya, Wiltfang, & Gierloff, 2015).

SERUM

Le processus de différenciation adipocytaire des cellules souches mésenchymateuses débute par la formation d'une monocouche de cellules quasi confluentes. Pour atteindre cette confluence les cellules souches mésenchymateuses sont donc cultivées dans un milieu contenant du sérum d'origine animale, sérum bovin fœtal dans le cadre de cette étude. Si le pourcentage de sérum contenu dans les milieux classiques est de 10%, un des milieux testés a montré que 3% de sérum pouvait néanmoins suffire. D'autres auteurs ont montré que le sérum de veau fœtal était le seul facteur qui influençait de manière significative la différenciation

adipocytaire et permet associés à d'autres additifs d'augmenter le nombre d'adipocytes (Lequeux, Auxenfans, Mojallal, Sergent, & Damour, 2009). Cependant, il a été montré qu'une culture trop prolongée de cellules souches mésenchymateuses dans un milieu avec sérum animal réduisait la capacité de différenciation adipocytaire ; à cause de la présence de certains facteurs sériques présents comme le TNF- α ou le TGF- β (Hauner et al., 1989). Par conséquent, pour pallier à ce problème, certains auteurs ont recommandé l'utilisation de sérum humain comme alternative (Hemmrich et al., 2005) ou encore proposé de nouveaux milieux sans sérum. Mais lors de ce travail, ce type de milieu n'a pas pu permettre la croissance cellulaire nécessaire à la différenciation et a entraîné la mort des cellules.

DEXAMETHASONE, IBMX et INSULINE

Le point commun des 3 milieux ayant entraînés une différenciation adipocytaire est la présence de dexaméthasone et de 3-isobutyl-1-méthylxanthine (IBMX). La dexaméthasone est une hormone glucocorticoïde de synthèse jouant un rôle important dans l'induction adipocytaire en permettant l'accumulation du facteur de transcription PPAR γ (Alliot-Licht et al., 2005). L'effet des glucocorticoïdes sur la différenciation adipocytaire peut être amplifié par l'IBMX qui améliore l'expression de PPAR γ ou encore de la lipoprotéine lipase (LPLase) tout en diminuant l'expression du gène maître de la différenciation ostéogénique Runx-2. L'insuline tient un rôle essentiel dans la liposynthèse en stimulant l'absorption des acides aminés et du glucose dans la cellule. L'insuline permet la stimulation de l'activité de la LPLase et la neutralisation de l'effet lipolytique du cortisol. L'insuline a montré une augmentation de la prolifération cellulaire. Néanmoins, comme on a pu le constater dans cette étude, l'IBMX et l'insuline ne permettent pas à eux seuls d'induire la différenciation adipogénique et doivent donc être utilisés en association.

INDOMETACINE

L'indométacine est un anti-inflammatoire non stéroïdien qui agit comme agoniste du récepteur PPAR γ en se liant à lui et permet ainsi l'expression des marqueurs adipogéniques lors de culture de cellules mésenchymateuses en monocouche (Lehmann, Lenhard, Oliver, Ringold, & Kliewer, 1997). Contrairement à ce qu'il a pu être montré dans la littérature, dans notre étude, l'indométacine ne semble pas inhiber la différenciation ostéoblastique (Kellinsalmi et al., 2007).

L'ACIDE ASCORBIQUE 2L PHOSPHATE

L'acide ascorbique 2L phosphate n'est pas un additif couramment utilisé dans l'induction et le maintien de la différenciation adipocytaire. La concentration de l'acide ascorbique doit être élevée, car une faible concentration inhibe la différenciation (Kim, Choi, Yim, & Lee, 2013). Dans cette étude, l'acide ascorbique 2L phosphate à 250µM améliore la différenciation adipocytaire des cellules souches gingivales comme précédemment caractérisé dans une étude sur les ESC (Cuaranta-Monroy et al., 2014). Plus particulièrement, cela entraîne une augmentation du nombre de vacuoles lipidiques par rapport aux milieux qui en sont dépourvus. Par ailleurs, s'il est bien connu que l'acide ascorbique stimule la prolifération des cellules souches mésenchymateuses *in vitro*, aucune différence significative n'a été observée dans cette étude (Choi et al., 2008).

MODULATEURS DE L'INSULINE

La glitazone (rosiglitazone / pioglitazone) joue un rôle central dans le processus de différenciation adipocytaire *in vitro* des cellules souches mésenchymateuses, comme agoniste du récepteur PPAR γ ou encore comme sensibilisateur à l'insuline (Yuan, Guo, Zhou, Shen, & Chen, 2014). La triiodothyronine (T3) est une hormone thyroïdienne qui en interagissant avec le récepteur thyroïdien $\alpha 1$ (TR $\alpha 1$) multiplie les effets de l'insuline ; et permet l'amélioration de la différenciation adipocytaire (Ortega et al., 2009). L'hydrocortisone est décrite pour permettre une meilleure prolifération des cellules dans les milieux de différenciation (Hanks, 1979). Néanmoins, cette capacité est actuellement remise en cause (Van Harmelen et al., 2004). Notre étude ne peut conclure sur le rôle de ces molécules ; les milieux en étant constitués ayant entraînés l'arrêt de la prolifération ou la mort des cellules.

UCP1

L'activité métabolique des adipocytes lors de la régulation thermique est à l'origine de l'activation de la protéine UCP1 (ou thermogénine), laquelle permet d'utiliser de l'énergie pour la thermorégulation, et non plus pour la production d'adénosine tri-phosphate. Cette protéine est présente dans les mitochondries du tissu adipeux brun. De plus, les adipocytes bruns sont décrits comme ayant un noyau central et un cytoplasme rempli de nombreuses petites vacuoles lipidiques (Saely, Geiger, & Drexel, 2012). Les adipocytes formés lors de l'induction adipocytaire des cellules souches mésenchymateuses formeraient de la graisse brune.

CONCLUSION

En conclusion, cette étude démontre l'intérêt de l'utilisation d'un milieu de culture adapté pour l'induction de la différenciation adipocytaire des cellules souches gingivales. Elle a permis de prouver l'importance de chaque composant afin de sélectionner le milieu idéal pour ces cellules.

V^{ème} PARTIE**EXEMPLE D'UTILISATION DES CELLULES SOUCHES ORALES EN BIOMATERIAUX**

La biocompatibilité a pendant longtemps été synonyme d'inertie, c'est-à-dire qu'un matériau ne posant aucun problème biologique était tout simplement considéré comme biocompatible. En fait, la biocompatibilité est la capacité d'un matériau à induire une réponse biologique appropriée à une application donnée dans le corps. Plus précisément, c'est la façon dont réagit un matériau dans un environnement donné. Ainsi, le matériau doit pouvoir remplir une fonction thérapeutique et induire la réponse biologique la plus appropriée; sans provoquer d'effets locaux ou systémiques indésirables chez le receveur (D. F. Williams, 2008). Plusieurs facteurs doivent donc être pris en compte lors de l'évaluation de la réponse biologique ; tels que l'emplacement du matériau ou encore la durée de contact du matériau avec le corps.

De nos jours, les méthodes qui étudient la biocompatibilité d'un biomatériau sur des cellules *in vitro* ont été reconnues et adoptées par les organismes de réglementation internationaux ; devenant de réelles alternatives à l'expérimentation animale. Ainsi, le recours à des procédés évaluant la toxicité de matériaux en utilisant des tissus ou cellules *in vitro* est devenu courant. La plupart du temps, les cellules utilisées dans les études sont des lignées immortalisées NHK (normal human keratinocytes) ou des fibroblastes issus de rongeurs 3T3. Ces lignées présentent plusieurs avantages de manipulation telle qu'une prolifération facile, rapide et illimitée mais possèdent des propriétés souvent différentes du tissu d'origine. Le recours à des cultures primaires de cellules issues du tissu ciblé s'avèrent donc de plus en plus fréquent. Ainsi, dans les études qui vont suivre, les essais de biocompatibilité ont été réalisés *in vitro* sur des cultures de cellules souches mésenchymateuses dérivées de la gencive (CSG) ou de la pulpe dentaire (DPSC) dans le but de simuler les interactions *in vivo* des biomatériaux dans leur microenvironnement buccal et dentaire.

I- RÉSUMÉ DE L'ARTICLE: « EFFECTS OF HIGH-TEMPERATURE-PRESSUREPOLYMERIZED RESIN-INFILTRATED CERAMICNETWORKS ON ORAL STEM CELLS »

Les pertes de tissus minéralisés dentaires tels que l'émail ou la dentine à la suite de malformations, caries, lésions cervicales d'usures ou encore de traumatismes sont une réelle préoccupation en odontologie. Afin de restaurer l'intégrité et la fonction de la dent, ces pertes nécessitent d'être comblées par des matériaux biocompatibles, esthétiques, fonctionnels, et si possible durables.

Actuellement, les matériaux en résine composite constitués de charges minérales noyées dans une matrice de polymère organique sont couramment utilisés. Ils offrent une simplicité d'utilisation, d'application et de réparation. Néanmoins, certains désavantages d'ordre biologique sont de nos jours pointés du doigt. En effet, certains composants organiques tels que le Bis-GMA (diméthacrylate glycidique de bisphénol A), le TEGDMA (TriEthylène Glycol DiMéthAcrylate) ou encore l'UDMA (diméthacrylate d'uréthane) peuvent constituer un risque biologique en cas de mauvaise utilisation ([Ferracane, 2011](#)).

De nos jours, l'arrivée de la confection et fabrication assistée par ordinateur (CFAO ou CAD-CAM pour les anglophones) a quelque peu modifié la dentisterie restauratrice. Cette méthode permet au praticien de traiter de gros défauts dentaires en une seule séance ; en alliant une empreinte optique à un usinage d'un bloc de matériau. Ainsi, la céramique apparaît comme un matériau de choix, car elle présente une excellente biocompatibilité, de très bonnes propriétés optiques et mécaniques pérennes ([Fron & Smail, 2013](#)). Cependant, les réinterventions comme une réparation ou un « recollage » peuvent s'avérer difficile en fonction du type de céramique.

Dans le but de pallier aux désagréments de ces deux types de matériaux (résine composite et céramique), de nouveaux matériaux hybrides entre ces deux formes ont été mis au point. Les céramiques dentaires hybrides (RIGCN) dotées d'une structure à double réseau avec un réseau principal de céramique dans lequel s'imbrique un second réseau de polymère ; ont ainsi vu le jour ([Nguyen, Ruse, Phan, & Sadoun, 2014](#)).

La cytotoxicité et la biocompatibilité des deux composants ont déjà été évaluées indépendamment, mais leur association ne l'a jamais encore été. A cet égard, des cellules souches dérivées de la pulpe dentaire (DPSC) et de la gencive (CSG) ont été sélectionnées afin

d'évaluer trois types de céramiques dentaires hybrides : Enamic (VITA ®), EHM (Matériau hybride expérimental), EHM_i (EHM associé avec un initiateur).

OBJECTIFS

Ce travail expérimental est axé sur la comparaison de trois céramiques dentaires hybrides (RIGCN) dont deux nommées EHM et EHM_i sont à l'état expérimental : Enamic (VITA ®), EHM (Matériau hybride expérimental), EHM_i (EHM associé à un initiateur).

Le premier objectif de ce travail a consisté à comparer la biocompatibilité de ces trois RIGCN à un matériau composite classique Z100TM ; sur des cellules souches mésenchymateuses pulpaire et gingivales.

Le second objectif a consisté à observer si une fois en contact avec les cellules souches mésenchymateuses pulpaire et gingivales ; ces matériaux ne modifiaient pas le phénotype de ces cellules. Pour ce faire deux types de contact ont été matérialisés : le contact « direct » et le contact « indirect ». Concernant le premier, le matériau est physiquement présent au contact des cellules ; alors que pour le second, il y a une barrière physique hydrophile et perméable entre le matériau et les cellules testées.

Afin d'évaluer la biocompatibilité de ces matériaux, la viabilité, la prolifération et la morphologie cellulaire ont été mises en évidence au bout d'une semaine. De plus, un marquage immuno-histologique du cytosquelette et des molécules produites par la matrice extracellulaire, ainsi qu'une analyse génique du stress et de l'inflammation ont été réalisés.

RESULTATS

Premièrement, le test de vitalité a montré que les cellules survivent en présence des différents biomatériaux après 1 semaine ; et leur prolifération ne semble pas modifiée.

Deuxièmement, les tests de cytotoxicité et d'apoptose en contact direct ont montré que les trois biomatériaux Enamic, EHM et EHM_i s'avèrent moins toxiques pour les cellules que le composite classiquement utilisé Z100.

Troisièmement, l'analyse de l'expression des marqueurs IL-1 β et de métalloprotéinase matricielle 9 (MMP-9) ont permis de montrer qu'aucune réponse inflammatoire n'est détectée dans les cellules souches mésenchymateuses ; dans les conditions testées.

Pour finir, l'immuno-histochimie a permis de montrer que les biomatériaux testés ne désorganisent pas l'architecture cellulaire et n'entraînent pas de diminution de la sécrétion de collagène de type I dans les cellules testées.

Les quatre matériaux testés étudiés dans cette étude ont montré peu de différences entre eux et peuvent donc être considérés comme biologiquement compatibles. Les propriétés physiques et optiques de ces nouvelles céramiques hybrides ayant déjà été évaluées auparavant ; l'étude de l'absence d'effets néfastes sur les cellules orales permettra leur parfaite intégration dans l'environnement oral. Ces résultats s'avèrent donc particulièrement intéressants pour de futures applications de restaurations thérapeutiques de dents endommagées.

RESEARCH ARTICLE

Effects of High-Temperature-Pressure Polymerized Resin-Infiltrated Ceramic Networks on Oral Stem Cells

Mathilde Tassin², Eric Bonte^{1,2,4}, Ludwig S. Loison-Robert^{1,2}, Ali Nassif^{1,2}, Tsouria Berbar², Stéphane Le Goff³, Ariane Berdal^{2,5}, Michael Sadoun^{1,3}, Benjamin P. J. Fournier^{2,5*}

1 Faculty of Dentistry, Paris Descartes University, Sorbonne Paris Cité, France, **2** Laboratory of Molecular Oral Pathophysiology, INSERM UMRS 1138, Cordeliers Research Center, 15 rue de l'école de médecine, Paris, F-75006, France; Paris-Descartes; Pierre and Marie Curie; Paris-Diderot Universities, Paris, F-75006, France, **3** URB2i, Faculty of Dentistry, Paris Descartes University, Sorbonne Paris Cité, France, **4** Bretonneau Hospital, HUPNVS, AP-HP, Paris, France, **5** Faculty of Dentistry, Paris Diderot University, Sorbonne Paris Cité, France

☯ These authors contributed equally to this work.

* cijiben@gmail.com



OPEN ACCESS

Citation: Tassin M, Bonte E, Loison-Robert LS, Nassif A, Berbar T, Le Goff S, et al. (2016) Effects of High-Temperature-Pressure Polymerized Resin-Infiltrated Ceramic Networks on Oral Stem Cells. PLoS ONE 11(5): e0155450. doi:10.1371/journal.pone.0155450

Editor: Gianpaolo Papaccio, Second University of Naples, ITALY

Received: October 27, 2015

Accepted: April 28, 2016

Published: May 19, 2016

Copyright: © 2016 Tassin et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the paper and its Supporting Information files.

Funding: This work was supported by the AFDS (Association Française pour le Développement de la Stomatologie) received by MT and INTERMIND platform, Paris Diderot University. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

Abstract

Objectives

The development of CAD—CAM techniques called for new materials suited to this technique and offering a safe and sustainable clinical implementation. The infiltration of resin in a ceramic network under high pressure and high temperature defines a new class of hybrid materials, namely polymer infiltrated ceramics network (PICN), for this purpose which requires to be evaluated biologically. We used oral stem cells (gingival and pulpal) as an *in vitro* experimental model.

Methods

Four biomaterials were grinded, immersed in a culture medium and deposited on stem cells from dental pulp (DPSC) and gingiva (GSC): Enamic (VITA®), Experimental Hybrid Material (EHM), EHM with initiator (EHMi) and polymerized Z100™ composite material (3M®). After 7 days of incubation; viability, apoptosis, proliferation, cytoskeleton, inflammatory response and morphology were evaluated *in vitro*.

Results

Proliferation was insignificantly delayed by all the tested materials. Significant cytotoxicity was observed in presence of resin based composites (MTT assay), however no detectable apoptosis and some dead cells were detected like in PICN materials. Cell morphology, major cytoskeleton and extracellular matrix components were not altered. An intimate contact appeared between the materials and cells.

Clinical Significance

The three new tested biomaterials did not exhibit adverse effects on oral stem cells in our experimental conditions and may be an interesting alternative to ceramics or composite based CAD—CAM blocks.

Introduction

Loss of dental mineralized tissues caused by decay, erosion, congenital dental defects or trauma needs to be filled by biocompatible, functional, sustainable and if possible, aesthetic materials. Nowadays, Computer-Aided Design and Computer-Aided Manufacturing (CAD-CAM) devices are changing the actual pattern of restorative dentistry. This chairside method allows the practitioner to treat large dental defects in only one session while it needed with conventional means several appointments and the intervention of a dental technician. CAD-CAM method allies an optical impression with a direct processing of material block by a milling unit. CAD-CAM processes may use either composite or ceramics materials. The properties of CAD-CAM materials *per se* should be considered and optimized.

In this respect, ceramics present excellent biocompatibility, the best optical and good mechanical properties as well as sustainability [1]. The main pitfall of ceramics is the requirement and the difficulty of a re-intervention on altered fillings. Indeed, repair and rebonding may be difficult according to ceramics type. In CAD-CAM processing, another disadvantage of ceramics is their toughness which increases block milling time and the frequency of cutter replacement.

In contrast, resin-based composite blocks advantages are their easiness of both bonding and repair, with however optical and mechanical inferior properties compared to ceramics. Resin-based composites are composed of an organic polymer matrix with inorganic filler particles (usually glass). Their Young's modulus is close to that of dentin. The strengths and weaknesses of the materials are linked to their polymer organic components (Bisphenol A glycidylmethacrylate (Bis-GMA), triethylene glycol dimethacrylate (TEGMA), urethane dimethacrylate (UDMA) for example) [2]. These may constitute a biological risk in case of poor polymerization, with a release of monomers or their microleakage at the tooth-filling interface [3].

In order to circumvent material weakness, new materials have been designed few years ago. These are hybrids of the two formers [4]. Sintered ceramics porous blocks are silanated. Infiltration of the monomers through the network is performed under high pressure and high temperature, with the polymerization occurring at the same time. These materials present better fracture toughness and flexural strength than classical composites [5]. This is partly due to their higher volume fraction filler (Table 1). Furthermore, high pressure–high temperature polymerization allows a better conversion rate, which limits putative monomer release in saliva [6]. Additionally, considering experimental evidences on Bisphenol A monomer toxicity in several pathologies [7], the present materials replaced bisphenol A based resins by bisphenol A-free resins (UDMA in this study).

These alternative hybrid materials which combine the advantages of the former two materials are a newly explored research area. Founding studies on their mechanical properties placed them between classical ceramics and composite materials [8]. As the resin cannot be only infiltrated by capillary action, pressure has to be applied to improve the infiltration and to limit polymerization associated shrinkage. Higher infiltration pressure gave better mechanical properties [4], reduced the shrinkage by reducing free volume and may also limit the development of internal stress [5]. Although their components have already been independently evaluated in

terms of cytotoxicity and biocompatibility, the biological safety of their association within the same material also needs to be evaluated here.

Material biocompatibility [9] may be first evaluated by general *in vitro* cytotoxicity testing [10]. Among cells used for these investigations, NHK or 3T3 fibroblasts are probably the most frequently used cells [10]. In this work, *in vitro* assays were performed in models which mimic *in vivo* interactions of oral cells with dental biomaterials. In this respect, oral mesenchymal stem cells have been isolated several years ago. These ones are nowadays well characterized and identified as defined in 2006 [11]. Their advantages are an easy access, high proliferation rate combined with their ability to maintain a stable phenotype [12] [13]. Dental pulp (DPSC) and gingival stem cells (GSC) were selected here to evaluate the *in vitro* impact of biomaterials on cells exposed indirectly in the buccal and dental microenvironment. This study combined the characterization of their viability, proliferation, morphology, extracellular matrix production, inflammation and analyzed cell contacts with the biomaterial.

This experimental work focused on three (two of them are experimental, although already described Nguyen et al. [5]) High-Temperature-Pressure Polymerized resin-infiltrated glass-ceramic networks (RIGCN), using a resin-based composite (3M Co., St. Paul, MN, USA) as a reference. The hypotheses tested were that: 1- RIGCN are as biocompatible as classic dental composites and 2- they do not alter the phenotype of mesenchymal cells which are in direct or essentially indirect contact with materials within the dental and oral microenvironment.

Materials & Methods

Cell isolation

Human stem cells were extracted from dental pulp and gingiva as already described [14,15]. This research followed the statements found in the “Helsinki Declaration”, written informed consents were obtained. This was approved by the Office of Research Ethics of the University of British Columbia and by Paris local ethics committee.

Cell culture

After isolation, cells were seeded in “proliferating medium” composed with classical Low Glucose Dulbecco’s modified eagle medium (DMEM 1X)—GlutaMAX™(Gibco®), Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) containing 10% Fetal Bovine Serum (FBS), 1% non-essential amino acids MEM 100X (Gibco®), 1% Penicillin-Streptomycin (10,000 U/mL) (Gibco®) and 0,5% Fungizone® Antimycotic (Gibco®) supplemented with 50 µg/mL 2-Phospho-L-ascorbic acid trisodium salt (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) at 37°C in 5% CO₂ incubator. To generate

Table 1. Composition and properties of the biomaterials.

NAME	MATRIX	FILLER	Vf (%)	CONFIGURATION	INITIATOR	POLYMERIZATION	Flexural strength (MPa)	Fracture toughness (Mpa.m1/2)
Enamic (Vita)	UDMATEGMA	Feldspathceramic enriched with aluminum oxide	75	Sintered block	Benzoyl Peroxyde	As-received CAD/CAM blocks	150	1.5
EHM	100% UDMA	VITA Mark II	73.8	Sintered block, 800°C	None	HT/HP	288.3+/- 39.6	2.8+/- 0.7
EHMi	100% UDMA	VITA Mark II	73.8	Sintered block, 800°C	Di-tert-amyl peroxide	HT/HP	305.2+/- 53.7	2.7+/- 0.5
Z100 (3M)	Bis GMATEGDMA	Zirconia Silica0.6 µm	64.2	Mixing with matrix	Ternary initiator system	As-received CAD/CAM blocks	138.2 +/-24.3	0.8+/- 0.2

doi:10.1371/journal.pone.0155450.t001

colony forming unit cultures (CFU) cells were seeded at low density (<100 cells/cm²) on 10 cm Petri dishes and cultured as above until colonies appeared.

Colony efficiency assays

After 14 days of culture, cells were fixed using Phosphate Buffered Saline 1X (PBS; pH 7.4) containing 4% paraformaldehyde (PFA) / 5% sucrose for 10 min at 4°C; and then stained with 0.05% (w/v) crystal violet. Colonies were observed under microscope (EVOS Invitrogen).

FACS analysis

Cells were detached using 0.02% Trypsin/EDTA solution in PBS and collected (5 min at 400 r.p.m.), washed in 3% FBS in PBS at 4°C, then incubated in solutions of CD29, CD31, CD45, CD90, CD105, CD146 and Stro1 markers in 3% BSA in PBS for 60 min at room temperature. Cells were then washed 3-times by centrifugation at 400 g for 5 min and resuspend them in 3% FBS/PBS. Cells were suspended again for observation.

Osteogenic and adipogenic differentiation

Osteogenic and adipogenic differentiation were induced with selective media as already described [14]. Briefly, osteogenic differentiation was obtained after 14 days of culture in medium composed of “proliferating medium” supplemented with 10% Fetal Bovine Serum (FBS), 50 µg/mL 2-Phospho-L-ascorbic acid trisodium salt, 10 nM dexamethasone and 10 mM beta-glycerophosphate. Adipogenic differentiation was obtained after 14 days in medium composed of “proliferating medium” supplemented with 10 µg/mL Insulin, 0,5 mM IBMX and 50 µM indomethacin and 1 µM dexamethasone. Staining with Alizarin Red S and Oil Red O were used to assess osteogenic and adipogenic differentiation, respectively.

Tested Biomaterials

Three RIGCN and one commercialized photopolymerized composite resin were tested. Chemical components and main physical properties of these biomaterials are summarized in [Table 1](#). Briefly, the biomaterials were transformed in powder by grinding under cold conditions (-20°C) and sterilized by dry heat.

Preparation of Biomaterial solutions

Basal medium without phenol red. The basal medium for biomaterials was the classical medium without phenol red and supplemented with 50 µg/mL 2-Phospho-L-ascorbic acid trisodium salt (Sigma-Aldrich).

Biomaterial stock solutions (BSS). After a titration test, a final concentration of 2 mg/mL was used for each biomaterial (Data not shown). Thus, the powder was added to the basal medium to prepare solutions of 10 mg/mL for each biomaterial and vortexed. The non-solubility property of the biomaterials in the basal medium was corrected by using 10% Ethanol in the stock solutions. This stock solution was added with a five times dilution to the cells.

2% Agarose, low gelling temperature solution (ALGS). Sterile Agarose low gelling temperature powder (Sigma-Aldrich) was added to the basal medium at 20 mg/mL. This solution was heat at 60°C for 5 min.

Cell proliferation and viability assays

30.10^3 cells were adhered for 2 h in 800 µL of basal solution per well in a 24-well plates. Then, 200 µL of BSS was added. Basal medium supplemented with 2% Ethanol served as control. The

rate of proliferation was estimated by performing MTT analysis on day 0, 8, 14 and 21 as indicated by the supplier (Sigma Aldrich). Cell number was determined by measuring the absorbance (570 nm) on a multi-plate reader (TrisStar LB 941). Cell proliferation was also detected with Ki67 immunostaining (see below). Ki-67 indexes were assessed by determining the total number of Ki-67 immunofluorescent cells divided by the total number of DAPI stained nuclei after 2 days of culture. Cell viability was performed with Calcein Red-Orange AM (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) as indicated by the supplier after 8 days of culture.

Direct and indirect cell contact cytotoxicity assays

Cells were used at confluence. Medium was removed at day 0. For direct contact, 800 μ L of basal solution and 200 μ L of BSS was directly added. For indirect contact, 200 μ L of 2% ALGS was placed on the cells during 1 h at 37°C to gellify. Then 800 μ L of basal solution and 200 μ L of BSS was added. A condition without biomaterial served as control. The absorbance was estimated by performing MTT assay on day 1 and 4. Cell apoptosis and death was evaluated by Biotium Kit (Annexin V–PI) as indicated by the supplier and with solutions of Annexin V and 7-AAD by FACS analysis after one week of culture. Positive controls were induced by staurosporin.

Scanning Electron Microscopy examination

30.10³ cells were plated and adhered on 2% gelatin coated 24 wells-coverslips for 2 h in 800 μ L of basal solution. Then, 200 μ L of BSS was added. Cells cultured in 1 mL of basal medium supplemented with 2% Ethanol served as control and the basal medium was changed every 3 days. After 7 days, coverslips were fixed with 4% PFA / 5% sucrose solution in PIPES for 10 min, rinsed in PIPES and incubated in 2.5% glutaraldehyde in PIPES for 5 min. After rinsing, coverslips were incubated with 0.5% osmium tetroxide for 60 min followed by dehydration in specific grade alcohol, and attached on sample holders and then coated with gold. The samples were examined using Scanning Electron Microscope. Microphotographs were taken with magnifications x400 and x1000.

Histochemistry

After 7 days in contact with biomaterials, coated coverslips cultures were fixed using 4% PFA / 5% sucrose in PBS for 10 min and were permeabilized using 0.5% Triton X-100 for 5 min at room temperature when needed. To block background staining, cells were treated with 1% BSA/ 1‰ glycine in PBS at 37°C for 20 minutes. Samples were then incubated with the primary antibody at 4°C overnight or at 37°C for 2 h and with appropriate secondary antibodies at 37°C for 1 h. Cell nuclei were stained using DAPI (Life Technologies Corporation). The antibodies used for immunostaining were: 1/100 monoclonal anti-fibronectin (Sigma-Aldrich) and HFN 7.1 (which was deposited to the DSHB by Klebe, R.J. (DSHB Hybridoma Product HFN 7.1)), 1/150 anti-collagen I (ab292; Abcam), anti-Ki67 (ab15580; Abcam), 1/50 monoclonal anti-vimentin (3CB2) was deposited to the DSHB by De La Rosa, E.J. (DSHB Hybridoma Product 3CB2)), 1/50 monoclonal anti-tubulin. Actin filaments were stained using 1/200 fluorochrome-coupled phalloidin (Life Technologies Corporation). Secondary antibodies were Alexafluor 488-conjugated goat anti-rabbit, Alexafluor 594-conjugated goat anti-mouse, Alexafluor 546-conjugated goat anti-mouse and Alexafluor 488-conjugated goat anti-mouse (Life Technologies Corporation). Samples were observed using a Zeiss microscope equipped with a digital camera.

Analysis of mRNA expression by RT-qPCR

After 7 days of culture with biomaterials, total RNA was extracted. RNA concentration and purity were evaluated by spectrophotometry (Nanodrop, Thermo Scientific, Wilmington, MA,

USA). Total RNA concentration and purity was measured and samples with OD260/280 ratio above 1.8 were used for the study. cDNA was synthesized using the Superscript II kit (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. For the qRT-PCR reactions, succinate dehydrogenase complex subunit A flavoprotein (SDHA), ubiquitin C (UBC) were used as reference genes on the Bio-Rad CFX manager software. Non-transcribed RNA samples and a water control were used as negative controls. The data were analyzed based on the comparative $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method (CFX Manager Software Version 2.1, Bio-Rad Laboratories). For primer sequences, see [Table 2](#).

Statistical analysis

Two primary cell lines of DPSC and of GSC were used in this study. All culture experiments were at least reproduced twice in triplicate. Statistical analysis was performed using one-way ANOVA (Kruskal Wallis modified Dunns test) and was carried out using Prism GraphPad 5 software (GraphPad Software Inc, La Jolla, CA, USA). Results are presented as mean \pm standard deviation (SD). Results were considered significant with a *p* value <0.05 . (on graphs *: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$; ***: $p < 0.001$; ****: $p < 0.0001$).

Results

Biomaterial characterization

Biomaterials differed in their monomer composition: Bis-GMA and TEGMA for Z100, a mixture of UDMA and TEGMA monomers for Enamic while EHM and EHM_i contained only UDMA monomers. Their fillers also varied: zirconia silica for Z100, feldspathic ceramics for Enamic and Vita Mark II™ for EHM and EHM_i ([Table 1](#)). Only EHM did not contain initiators of polymerization. SEM appearance differed little between the materials ([Fig 1](#)).

Stem cell characterization

GSC and DPSC were positive for the mesenchymal stem cells classical markers: CD29, CD90 and CD105. They were negative for the lineage associated markers: CD31 and CD45. Few of them were positive for Stro1 and CD146 markers ([Fig 1](#)). GSC cells formed CFU-F by limiting dilution ([Fig 1](#)) and were able to differentiate into adipocytes ([Fig 1H](#)) and osteoblasts ([Fig 1](#)) after 14 days. DPSC were able to form CFU and mineralized matrix in the same conditions (Data not shown).

Cytotoxicity

Calcein AM fluorescence revealed that most of the cells in contact with biomaterials were alive ([Fig 2](#)) like in control condition ([Fig 2](#)). After one week, cell cultured with the biomaterials were confluent like controls ([Fig 2](#)) and no dead cells were observed. Non-confluent cells were also exposed to the biomaterials and proliferation, monitored ([Fig 2](#)). After 2 days of culture, only EHM_i Ki-67 index differed from the control culture and was also different from EHM

Table 2. Primer sequences used for the study.

Genes	Primers sequences (5'>3')
<i>SDHA</i>	F: AGC AAG CTC TAT GGA GAC CT R: TAA TCG TAC TCA TCA ATC CG
<i>UBC</i>	F: GTG GCA CAG CTA GTT CCG T R: CTT CAC GAA GAT CTG CAT TGT CA
<i>IL1-β</i>	F: GTC TTC AAC AAG ATA GAA GTC AAG R: AGG TGC TGA TGT ACC AGT T
<i>MMP9</i>	F: ACA AGG ACA AGC TCT ACG GCT TCT R: TTT ATC AGG GCA GAA GCC CCA CTT

doi:10.1371/journal.pone.0155450.t002

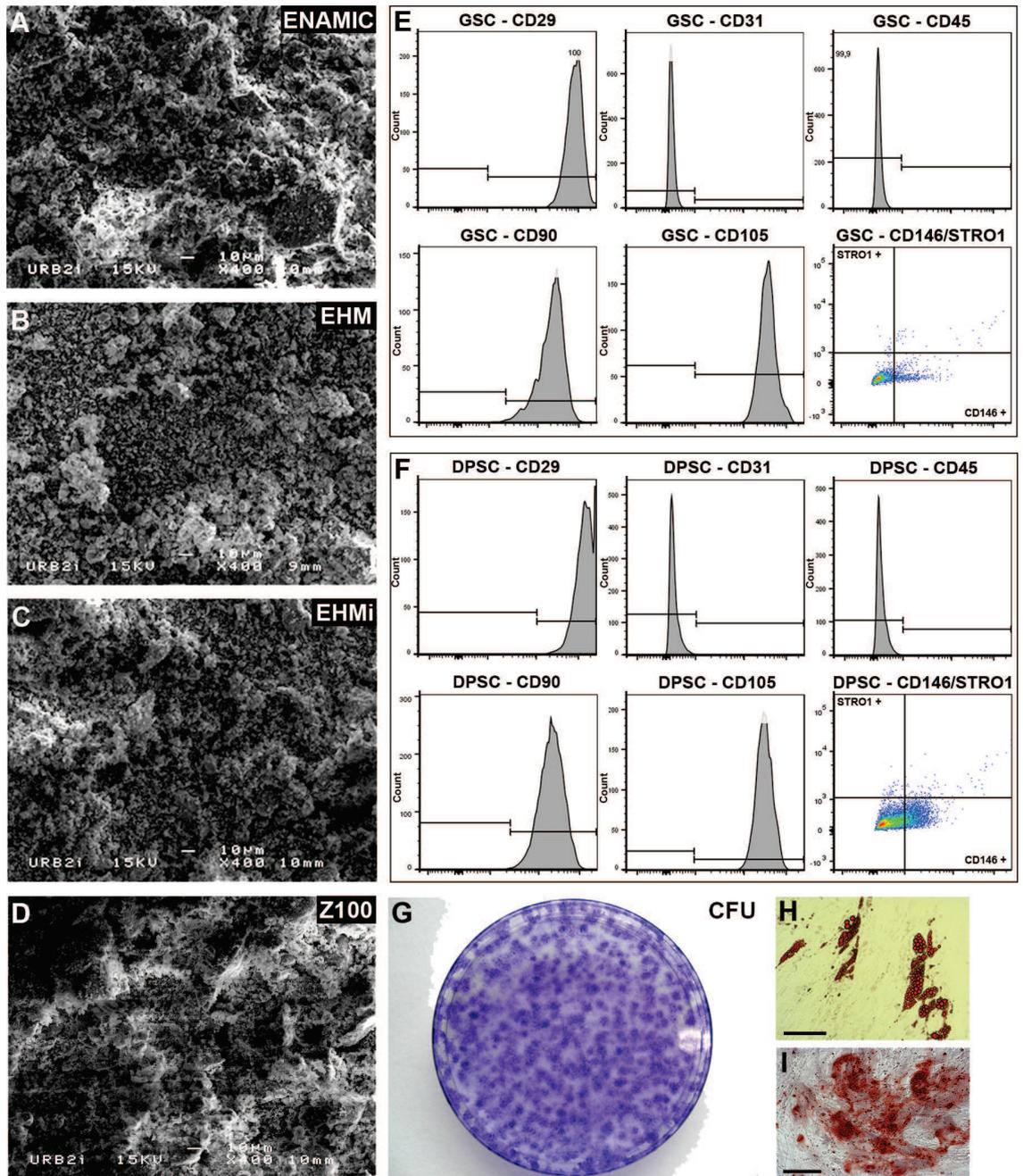


Fig 1. Biomaterials and stem cells characteristics. SEM microphotographs of the powdered materials. Enamic (Fig 1A), EHM (Fig 1B), EHMi (Fig 1C) and Z100 (Fig 1D). FACS analysis of classical mesenchymal stem cells markers (CD29, 90, 105, 146 and STRO1), of hematopoietic cells (CD45) and of endothelium (CD31) for GSC (Fig 1E) and DPSC (Fig 1F). CFU-F assays of the GSC (Fig 1G). Differentiation staining of the GSC after 14 days: Oil Red O staining (Fig 1H) and Alizarin Red S staining (Fig 1I). Scale bar 100µm.

doi:10.1371/journal.pone.0155450.g001

condition. Proliferation analysis revealed that in all conditions cells reached confluency at day 14. In contact with materials, cells number decreased on day 21. To understand if direct contact or diffusion would be involved, we reproduced the same experiment with the biomaterials

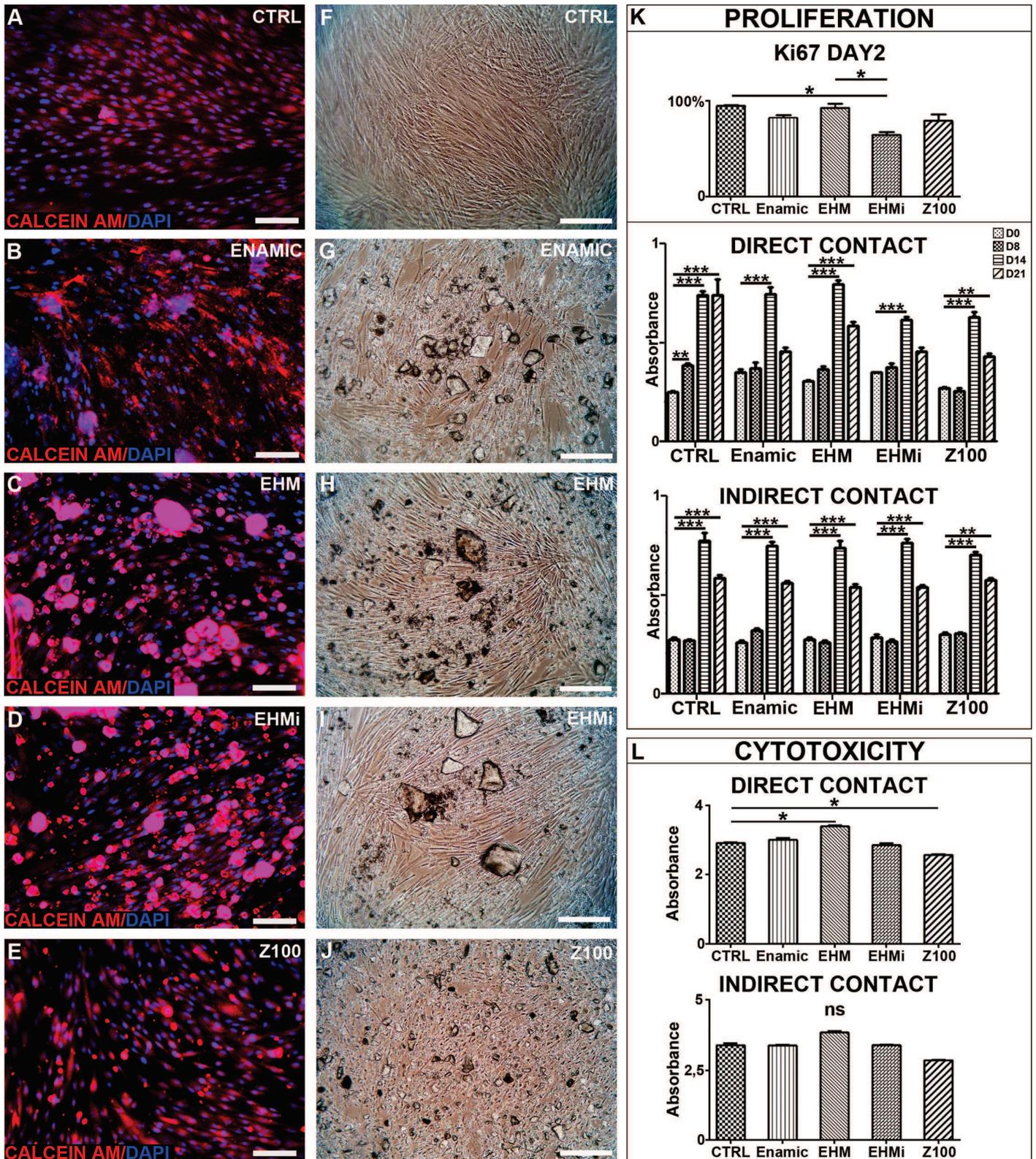


Fig 2. Proliferation and cytotoxicity analysis. Calcein AM viability assays for GSC cultured with the tested materials (Fig 2A-E). Cells microscopic morphology in the same conditions (Fig 2F-J). Scale bar 100 μ m. Figure 2K: Cellular proliferation analysis. Ki67 indexes graph for the 2 first days of culture in direct contact condition; MTT assays in direct contact or indirect contact for 21 days. MTT cytotoxicity assays in direct and indirect contact conditions (Fig 2L).

doi:10.1371/journal.pone.0155450.g002

lying on an agarose gel to avoid direct contact with the cells. In these indirect conditions, the cells reached confluency at day 14 then reached a plateau on day 21 lower than day 14 but significantly higher than initial cell number. In conclusion, the studied materials did not seem to greatly influence cell proliferation. Raw data can be found in [S1 Fig](#).

To further analyze cytotoxicity, we performed MTT assay on confluent cells exposed to the biomaterials for 96 hours ([Fig 2](#)). We noticed a significant decrease of MTT absorbance only for the Z100 condition. In indirect condition, no significant differences were observed. This underlined the requirement of a direct contact in the cytotoxic effect observed under Z100 exposure.

Apoptosis and cell death

Cells were incubated for a week in contact with biomaterials deposited on cells at 70% of confluence. We assessed apoptosis and cell death through the use of Annexin V and Ethidium bromide (Biotium kit) in immunofluorescence, respectively. Cells showed a fibroblastic morphological appearance unchanged under optical microscope and without cell death evidences in both material-exposed and control conditions. No apoptosis was noticed in culture after contact with biomaterials like in the control, except few dead cells observed in Z100 conditions ([Fig 3](#)). To analyse more precisely the cytotoxicity, we performed flow cytometry using AnnexinV and 7-AAD, staurosporin was used as a positive control for apoptosis. Few apoptotic cells were detected ([Fig 3](#)). This experiment revealed an induction of cell death in all the materials direct conditions, this was more evident with Z100 (28%) than in Enamic (6.66%), EHM_i (11.1%) and EHM (9.14%) ([Fig 3](#)).

Inflammatory response

Cells did not express IL-1 β and Matrix metalloproteinase 9 (MMP-9) (data not shown), generally associated with response to inflammation of connective tissue cells. In line with these results, total protein secretion was not modified by biomaterials contact, as measured by BCA assay ([Fig 3](#)).

Cytoskeleton and extra cellular matrix

At day 2 or day 8, the main components of the cellular cytoskeleton vimentin (intermediate filament), tubulin (microtubule) and actin did not change between cells cultured with biomaterials and control ([Fig 4](#)). Thus, the assessed biomaterials did not disrupt or disorganize cellular architecture. We finally studied the two main secreted molecules in ECM: type I collagen and fibronectin. Their distribution and expression levels did not appear altered in presence of the RIGCN and classical composite materials ([Fig 4](#)).

SEM Examination

SEM examination after 7 days revealed intimate contacts of cells for the materials. But, the adhesion of cells on the material was difficult to assess as the material is in powder. Cell shape was elongated and rather flattened in the control culture ([Fig 5](#)). Cells number appeared to decrease, especially for the Z100 ([Fig 5](#)). This decrease in cell number may be caused by a physical constraint of the powder which surface condition and numbers of particles were heterogeneous and would diminish the space available for cell growth.

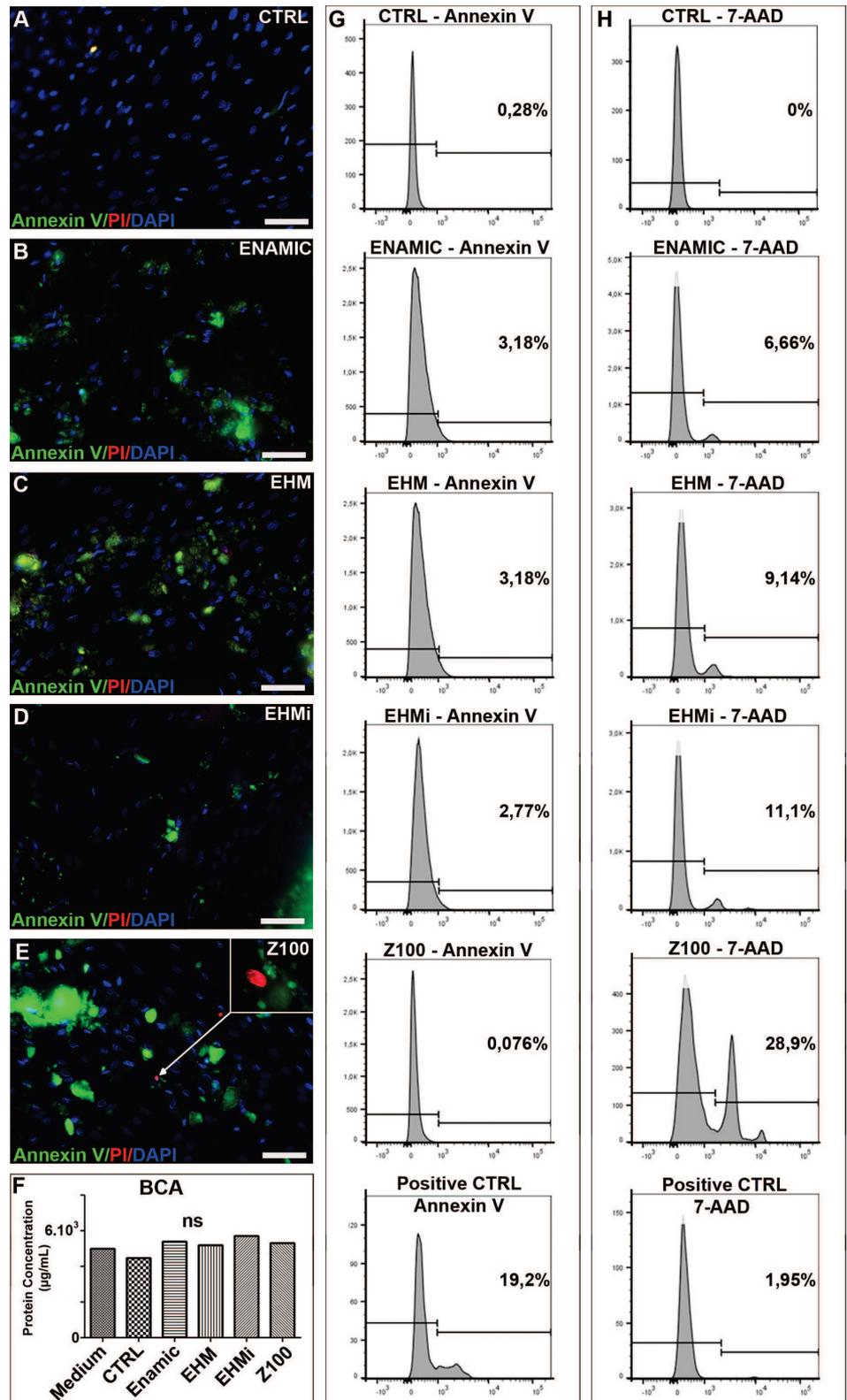


Fig 3. Apoptosis and cell death in contact with the biomaterials. Detection of apoptosis and cell death. Annexin V and propidium iodide fluorescent stainings of the GSC cultured with no materials (Fig 3A), Enamic (Fig 3B), EHM (Fig 3C), EHM_i (Fig 3D) and Z100 (Fig 3E). BCA measurement of the protein concentration in the respective culture conditions (Fig 3F). Flow cytometry analysis of the apoptosis marker Annexin V (Fig 3G) and of dead cells 7-AAD (Fig 3H). Scale bar 100µm.

doi:10.1371/journal.pone.0155450.g003

Discussion

The aim of this study was to evaluate the biocompatibility of three hybrid PICN materials (Enamic™, EHM and EHM_i) using the classical resin based composite as a reference and using two distinct oral mesenchymal cell culture models.

We evidenced that RIGCN are less cytotoxic than classical composites (MTT assay and flow cytometry analysis of 7-AAD) and do not induce a decrease in type I collagen secreting cells number. This is of particular interest for future applications. Indeed, blocks of the tested materials are intended to restore damaged teeth. In addition to their mechanical qualities which must be compatible with a sustainable tooth restoration, their appropriate biological properties will be the guarantors of an optimal restoration tolerance. As physical properties of these materials have been previously evaluated [6,16], the present study on their biological effects on oral cells might give some robustness for clinical transfer in dentistry.

It should be kept in mind that these materials will not usually be in direct contact with tissues and cells. First, within the oral environment, the dental restorative biomaterials will interact through biofilms layered on their surface. This biofilm is one of the factors that contribute to surface degradation of composite resins [17] while ceramics retains only a thin biofilm [18]. Despite the contact with gingival tissue is indirect, these biomaterials cytotoxicity is significant to explore because this biofilm behaves like a permeable membrane. Concerning the teeth, a dentin barrier is normally interposed between dental pulp cells and the material, second a layer of bonding agent or cement lays between restoration and dental tissue. However, oral cells and tissues may be challenged in the oral microenvironment. And, materials or more specifically their individual components might reduce their healing ability. In this respect, GSC and DPSC were used here, as candidate cells recruited *in vivo* in case of aggression or inflammation and able to differentiate. More specifically, in conditions where adhesive or dentin barrier is affected, a reparative process is initiated [19]. And, pulp stem cells are actively involved in dentin and pulp tissue regeneration [20]. Consequently, pulp stem cells have been used to test molecules used in restorative dentistry[21]. All these considerations led us to select DPSC and GSC stem cells to evaluate here potential effects of the emerging new CAD-CAM materials.

The components of composite resins have essentially been reported to be toxic when individually applied [22]. Although some of the basic monomers, such as BisGMA or UDMA, are poorly soluble in water, *in vitro* studies have demonstrated that the primary leachable component from composites was UDMA monomer. However, long-time curing, post-curing for 24 hours and removal of the oxygen-inhibited surface layer decrease the cytotoxicity of composite materials[23]. Powders of experimental blocks tested in this study contained UDMA with or without initiator. This monomer is intimately linked to the ceramic network because its polymerization is made under high temperature and high pressure [5]. The resulting blocks are free from surface inhibited layer and their stability, improved [16]. Machining of blocks might raise the temperature and mobilize this monomer. But such an event is unlikely if appropriate cooling of instruments is implemented. In addition, the structure of the material with a single polymer preserves from synergistic cytotoxic effects [24] and easy leaching into the medium, due to the nature of the chemical components and the existing bonds between them[25]. The control material (Z100, 3M) contained BisGMA and TEGDMA. Cell viability at its contact has been

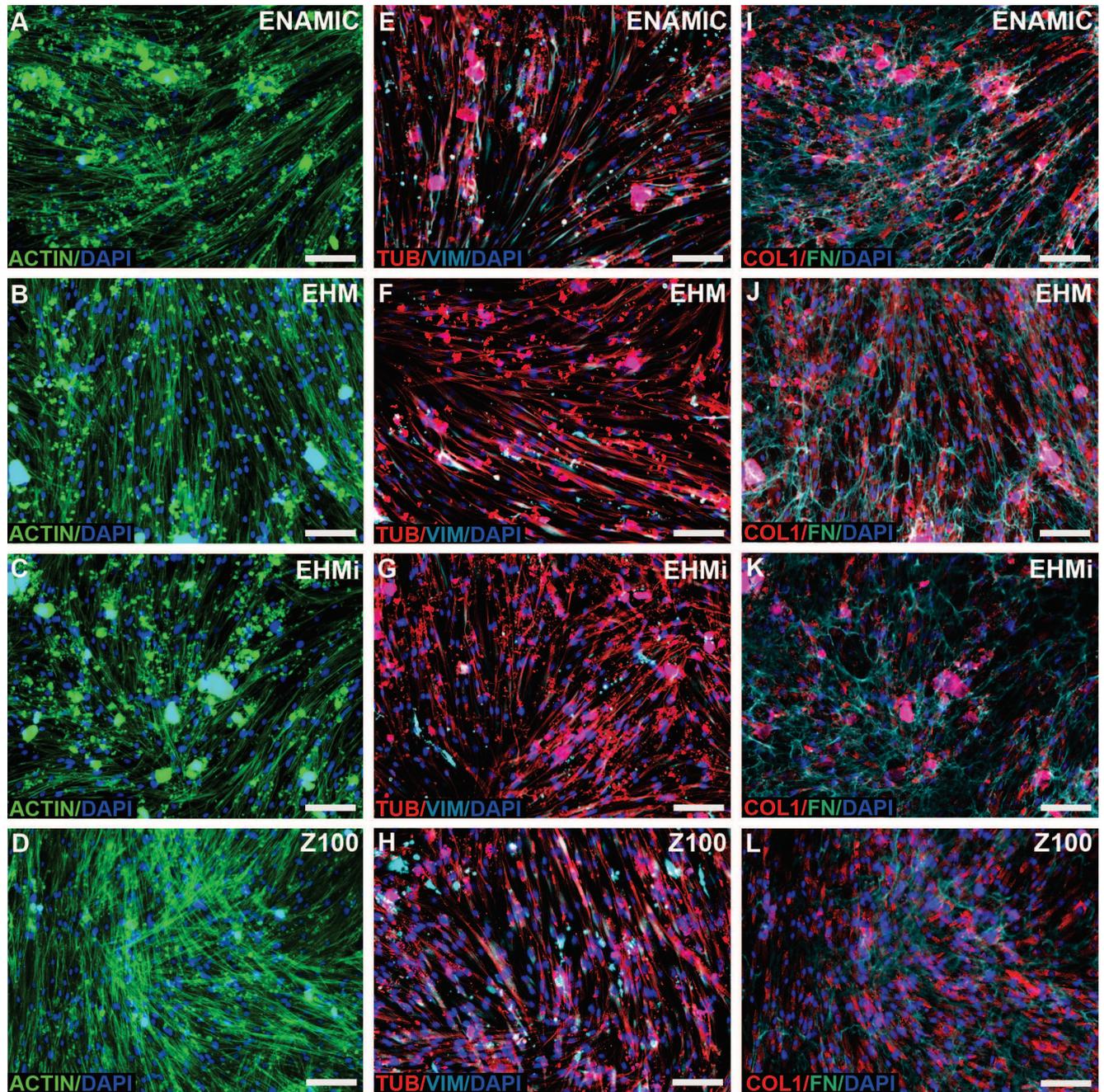


Fig 4. Cytoskeleton and extracellular matrix components analysis. Actin and Dapi fluorescent stainings of GSC cultured with either Enamic (Fig 4A) or EHM (Fig 4B) or EHM_i (Fig 4C) or Z100 (Fig 4D). Tubulin, Vimentin and Dapi immunofluorescent stainings of DPSC cultured with either Enamic (Fig 4E) or EHM (Fig 4F) or EHM_i (Fig 4G) or Z100 (Fig 4H). ProCollagen 1alpha1, Fibronectin and Dapi immunofluorescent stainings of GSC cultured with either Enamic (Fig 4I) or EHM (Fig 4J) or EHM_i (Fig 4K) or Z100 (Fig 4L). Scale bar 100µm.

doi:10.1371/journal.pone.0155450.g004

shown to be variable, depending on extracting media, with or without ethanol[25]. The results of cytotoxicity testing of the composite powder (direct contact) showed a decrease of living cells which was, albeit slight, statistically significant. In this respect, ethanol-water solution is known to accelerate extraction of composite components[26]. And, short term evaluations

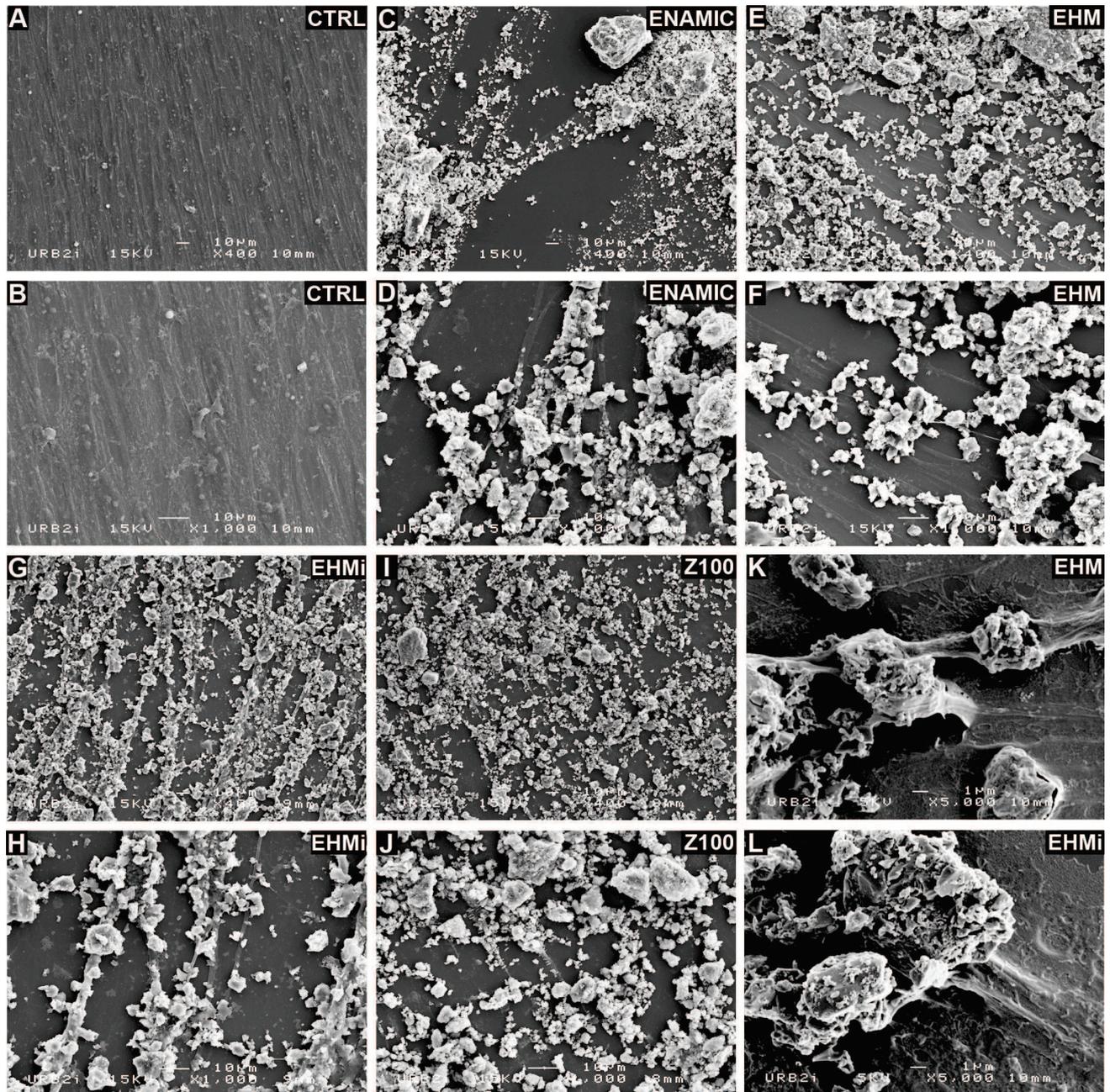


Fig 5. SEM Microphotographs of the studied materials. Z100 (Fig 5I and J), Enamic (Fig 5C and D), EHM (Fig 5E and F), EHM_i (Fig 5G and H) and of the cultured cells (Fig 5A and B). Higher SEM magnification of the interactions between cells and EHM (Fig 5K and L).

doi:10.1371/journal.pone.0155450.g005

have been using high ethanol concentration (75 to 96%) to assess the material extracts [27]. 75% ethanol has a solubility parameter which matches that of BisGMA and promote its release for a longer time window and in higher amount [28]. It should be kept in mind that ethanol extraction media is not physiologically relevant. Thus, our samples were conditioned in a culture medium with only 2% ethanol to improve the contact of the powder with the cells and assessment was made at day 7. These experimental conditions might mimic the oral

environment wherein the material is immersed and low ethanol concentration does not interfere with the release of the constituents. Finally, the formulation in powder may be at the origin of the decrease in cell number observed in SEM due to lack of space in cell development[29]. But, *in fine*, biomaterials do not directly inhibit cell proliferation as shown by stable Ki67 expression.

Our study also evidenced that biomaterials did not alter cells cytoskeleton and adversely affect the synthesis of the main extra-cellular matrix components. SEM examinations provided another lightening on cell morphology. Among the variables related to the structure and composition of biomaterials, one of the main parameters is surface topography, as it influences *in vitro* cell behavior in term of cell morphology, proliferation and adhesion[30]. In order to limit surface topography effects, samples were grinded from a polymerized block. Our observations did not check which molecules are involved in cell adhesion to the materials.

Interestingly, all the tested biomaterials did not modify proliferation, extracellular matrix synthesis, morphology or inflammatory response in our experimental conditions. Some studies have reported cytotoxicity of dental composites, which was observed here. In these studies, dental composites components were used before polymerization while here, we used stem cells and polymerized materials [31,32]. Still no adverse effect was reported in dental composite clinical use for the 20 years they have appeared[2]. The classical composite cytotoxicity may be due to monomer microleakage since this latter was not polymerized under high pressure and high temperature. This means a less complete polymerization. Future studies may focus on the polymerization mode influence on cytotoxicity.

The four polymerized and powdered materials studied here showed few differences in our experimental conditions. Only significant cytotoxicity was observed for conventional composites using MTT assay and 7-AAD. Thus, the present study demonstrated that these new CAD—CAM materials would be safe to use in the oral sphere. As their intrinsic mechanical properties have been previously shown to be optimal [5], they would constitute an interesting alternative to ceramics or composite-based blocks for the present restorative dentistry based on CAD—CAM processing.

Supporting Information

S1 Fig. Raw datas and statistical analysis of the proliferations assays.
(XLSX)

Acknowledgments

We thank AFDS “Association Française pour le développement de la stomatologie” for MT’s grant. We also thank the laboratory of periodontal biology of the University of British Columbia, Vancouver, for providing gingival cells. We thank Urb2i, Paris Descartes University, for the access to the scanning electron microscopy facility.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: BF MS AB. Performed the experiments: MT EB LLR TB SLG AN. Analyzed the data: LLR TB AB MS BF. Contributed reagents/materials/analysis tools: AB MS BF. Wrote the paper: MT EB LLR AB MS BF.

References

1. Fron Chabouis H, Smail Faugeron V, Attal JP (2013) Clinical efficacy of composite versus ceramic inlays and onlays: a systematic review. *Dent Mater* 29: 1209–1218. doi: [10.1016/j.dental.2013.09.009](https://doi.org/10.1016/j.dental.2013.09.009) PMID: [24119328](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24119328/)

2. Ferracane JL (2011) Resin composite—state of the art. *Dent Mater* 27: 29–38. doi: [10.1016/j.dental.2010.10.020](https://doi.org/10.1016/j.dental.2010.10.020) PMID: [21093034](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21093034/)
3. Bouillaguet S (2004) Biological Risks of Resin-Based Materials to the Dentin-Pulp Complex. *Crit Rev Oral Biol Med* 15: 47–60. PMID: [14761899](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14761899/)
4. He LH, Swain M (2011) A novel polymer infiltrated ceramic dental material. *Dent Mater* 27: 527–534. doi: [10.1016/j.dental.2011.02.002](https://doi.org/10.1016/j.dental.2011.02.002) PMID: [21371744](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21371744/)
5. Nguyen JF, Ruse D, Phan AC, Sadoun MJ (2014) High-temperature-pressure polymerized resin-infiltrated ceramic networks. *J Dent Res* 93: 62–67. doi: [10.1177/0022034513511972](https://doi.org/10.1177/0022034513511972) PMID: [24186559](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24186559/)
6. Phan AC, Tang ML, Nguyen JF, Ruse ND, Sadoun M (2014) High-temperature high-pressure polymerized urethane dimethacrylate-mechanical properties and monomer release. *Dent Mater* 30: 350–356. doi: [10.1016/j.dental.2013.12.009](https://doi.org/10.1016/j.dental.2013.12.009) PMID: [24447416](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24447416/)
7. Jedeon K, De la Dure-Molla M, Brookes SJ, Loidice S, Marciano C, Kirkham J, et al. (2013) Enamel defects reflect perinatal exposure to bisphenol A. *Am J Pathol* 183: 108–118. doi: [10.1016/j.ajpath.2013.04.004](https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2013.04.004) PMID: [23764278](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23764278/)
8. Della Bona A, Corazza PH, Zhang Y (2014) Characterization of a polymer-infiltrated ceramic-network material. *Dent Mater* 30: 564–569. doi: [10.1016/j.dental.2014.02.019](https://doi.org/10.1016/j.dental.2014.02.019) PMID: [24656471](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24656471/)
9. Williams DF (2008) On the mechanisms of biocompatibility. *Biomaterials* 29: 2941–2953. doi: [10.1016/j.biomaterials.2008.04.023](https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2008.04.023) PMID: [18440630](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18440630/)
10. Rispin A, Stitzel K, Harbell J, Klausner M (2006) Ensuring quality of in vitro alternative test methods: Current practice. *Regul Toxicol Pharmacol* 45: 97–103. PMID: [16644076](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16644076/)
11. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, et al. (2006) Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 8: 315–317. PMID: [16923606](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16923606/)
12. Fournier BP, Larjava H, Hakkinen L (2013) Gingiva as a source of stem cells with therapeutic potential. *Stem Cells Dev* 22: 3157–3177. doi: [10.1089/scd.2013.0015](https://doi.org/10.1089/scd.2013.0015) PMID: [23944935](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23944935/)
13. Su-Min Lee QZ, Anh D. Le (2014) Dental Stem Cells: Sources and Potential Applications. *Current Oral Health Reports* 1: 34–42.
14. Ferre FC, Larjava H, Loison-Robert LS, Berbar T, Owen GR, Berdal A, et al. (2014) Formation of cartilage and synovial tissue by human gingival stem cells. *Stem Cells Dev* 23: 2895–2907. doi: [10.1089/scd.2013.0547](https://doi.org/10.1089/scd.2013.0547) PMID: [25003637](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25003637/)
15. Gronthos S, Mankani M, Brahimi J, Robey PG, Shi S (2000) Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 13625–13630. PMID: [11087820](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11087820/)
16. Nguyen JF, Migonney V, Ruse ND, Sadoun M (2013) Properties of experimental urethane dimethacrylate-based dental resin composite blocks obtained via thermo-polymerization under high pressure. *Dent Mater* 29: 535–541. doi: [10.1016/j.dental.2013.02.006](https://doi.org/10.1016/j.dental.2013.02.006) PMID: [23522657](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23522657/)
17. Busscher HJ, Rinastiti M, Siswomihardjo W, van der Mei HC (2010) Biofilm formation on dental restorative and implant materials. *J Dent Res* 89: 657–665. doi: [10.1177/0022034510368644](https://doi.org/10.1177/0022034510368644) PMID: [20448246](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20448246/)
18. Auschill TM, Arweiler NB, Brex M, Reich E, Sculean A, Netuschil L (2002) The effect of dental restorative materials on dental biofilm. *Eur J Oral Sci* 110: 48–53. PMID: [11878760](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11878760/)
19. Stanley HR, Pereira JC, Spiegel E, Broom C, Schultz M (1983) The detection and prevalence of reactive and physiologic sclerotic dentin, reparative dentin and dead tracts beneath various types of dental lesions according to tooth surface and age. *J Oral Pathol* 12: 257–289. PMID: [6193259](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/6193259/)
20. Simon SR, Berdal A, Cooper PR, Lumley PJ, Tomson PL, Smith AJ (2011) Dentin-pulp complex regeneration: from lab to clinic. *Adv Dent Res* 23: 340–345. doi: [10.1177/0022034511405327](https://doi.org/10.1177/0022034511405327) PMID: [21677089](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21677089/)
21. Soares DG, Basso FG, Hebling J, de Souza Costa CA (2015) Immediate and late analysis of dental pulp stem cells viability after indirect exposition to alternative in-office bleaching strategies. *Clin Oral Investig* 19: 1013–1020. doi: [10.1007/s00784-014-1321-3](https://doi.org/10.1007/s00784-014-1321-3) PMID: [25248948](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25248948/)
22. Wisniewska-Jarosinska M, Poplawski T, Chojnacki CJ, Pawlowska E, Krupa R, Szczepanska J, et al. (2011) Independent and combined cytotoxicity and genotoxicity of triethylene glycol dimethacrylate and urethane dimethacrylate. *Mol Biol Rep* 38: 4603–4611. doi: [10.1007/s11033-010-0593-1](https://doi.org/10.1007/s11033-010-0593-1) PMID: [21127987](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21127987/)
23. Mohsen NM, Craig RG, Hanks CT (1998) Cytotoxicity of urethane dimethacrylate composites before and after aging and leaching. *J Biomed Mater Res* 39: 252–260. PMID: [9457555](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9457555/)
24. Durner J, Wellner P, Hickel R, Reichl FX (2012) Synergistic interaction caused to human gingival fibroblasts from dental monomers. *Dent Mater* 28: 818–823. doi: [10.1016/j.dental.2012.04.031](https://doi.org/10.1016/j.dental.2012.04.031) PMID: [22579101](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22579101/)

25. Darmani H, Al-Hiyasat AS, Milhem MM (2007) Cytotoxicity of dental composites and their leached components. *Quintessence Int* 38: 789–795. PMID: [17873986](#)
26. McKinney JE, Wu W (1985) Chemical softening and wear of dental composites. *J Dent Res* 64: 1326–1331. PMID: [2936780](#)
27. Polydorou O, Trittler R, Hellwig E, Kummerer K (2007) Elution of monomers from two conventional dental composite materials. *Dent Mater* 23: 1535–1541. PMID: [17408734](#)
28. Polydorou O, Konig A, Hellwig E, Kummerer K (2009) Long-term release of monomers from modern dental-composite materials. *Eur J Oral Sci* 117: 68–75. doi: [10.1111/j.1600-0722.2008.00594.x](#) PMID: [19196321](#)
29. Fan C, Wang DA (2015) Effects of permeability and living space on cell fate and neo-tissue development in hydrogel-based scaffolds: a study with cartilaginous model. *Macromol Biosci* 15: 535–545. doi: [10.1002/mabi.201400453](#) PMID: [25557976](#)
30. Zizzari V, Borelli B, De Colli M, Tumedei M, Di Iorio D, Zara S, et al. (2013) SEM evaluation of human gingival fibroblasts growth onto CAD/CAM zirconia and veneering ceramic for zirconia. *Ann Stomatol (Roma)* 4: 244–249.
31. Shehata M, Durner J, Eldenez A, Van Landuyt K, Styllou P, Rothmund L, et al. (2013) Cytotoxicity and induction of DNA double-strand breaks by components leached from dental composites in primary human gingival fibroblasts. *Dent Mater* 29: 971–979. doi: [10.1016/j.dental.2013.07.007](#) PMID: [23915819](#)
32. Urcan E, Scherthan H, Styllou M, Haertel U, Hicke R, Reichl FX (2010) Induction of DNA double-strand breaks in primary gingival fibroblasts by exposure to dental resin composites. *Biomaterials* 31: 2010–2014. doi: [10.1016/j.biomaterials.2009.11.065](#) PMID: [20004467](#)

I- RÉSUMÉ DE L'ARTICLE: « IN VITRO EFFECTS OF SILICATE BASED MATERIALS BIODENTINE AND BIROOT RCS ON DENTAL PULP STEM CELLS IN DIRECT AND INDIRECT MODELS »

La dentisterie moderne, qu'elle soit endodontique ou restauratrice, vise à conserver et protéger l'intégrité de la dent ainsi que celle de l'os environnant. Maintenir la vitalité pulpaire et protéger le complexe dentino-pulpaire s'avèrent donc être des priorités dans pour la conservation fonctionnelle de la dent. Malheureusement, le tissu pulpaire peut facilement être contaminé ou encore endommagé par des causes variées telles que la carie ou encore les traumatismes. Ces phénomènes induisent généralement un processus de dentinogenèse tertiaire nécessaire à la préservation de la vitalité pulpaire (Smith & Lesot, 2001). A cet effet, deux types de dentine susceptibles de se former en réponse à un stimulus local, sont décrits dans la littérature. La dentine dite « réactionnelle » qui est sécrétée par les odontoblastes présents dans le tissu pulpaire; et la dentine « réparatrice » qui survient suite au recrutement de cellules progénitrices lorsque les odontoblastes meurent (Alliot-Licht et al., 2005; Smith & Lesot, 2001).

Ainsi, l'utilisation de ciment à base de silicates de calcium ayant des propriétés mécaniques proches de celle de la dentine est devenue monnaie courante en dentisterie conservatrice ; dans le but de conserver une dent ou protéger le complexe dentino-pulpaire. A cet effet, la Biodentine™ (BD) (Septodont, Saint Maur des Fossés, France) a été commercialisée pour différentes applications aboutissant toute à une dentinogénèse tertiaire ; telles que la pulpotomie ou encore le coiffage pulpaire (Malkondu, Kazandağ, & Kazazoğlu, 2014). Dans ce contexte, un nouveau ciment, BioRoot RCS (BR) (Septodont, Saint Maur des Fossés, France) a récemment été commercialisé pour l'obturation radiculaire d'une dent. Et à ce jour, peu d'études ont étudié ce matériau *in vitro* (Camps, Jeanneau, Ayachi, Laurent, & About, 2015; Dimitrova-nakov et al., 2015) et aucune ne l'a réalisée sur des cellules souches mésenchymateuses dérivées de la pulpe.

Les cellules souches mésenchymateuses pulpaires humaines (DPSC) partagent la même origine embryologique que les odontoblastes, possèdent un fort potentiel odontogène (Alliot-Licht et al., 2005) et jouent un rôle important dans le processus de guérison pulpaire grâce à la différenciation en des cellules « odontoblaste-like ». Les DPSC apparaissent donc comme un

modèle de choix pour une étude *in vitro* des effets biologiques de biomatériaux sur la dentinogenèse tertiaire.

Aussi, dans le but d'imiter la dentinogenèse tertiaire ou encore évaluer si celle-ci est due à un contact physique ou simplement à des échanges moléculaires entre le matériau et les DPSC; deux modèles de contact (direct et indirect) ont été comparés. L'originalité de cette étude repose sur l'utilisation d'un modèle indirect matérialisé par l'utilisation d'une fine membrane d'agarose interposée entre le matériau et les cellules.

OBJECTIFS

Le but de cette étude est donc d'évaluer la biocompatibilité et les éventuels effets biologiques de deux ciments à base de silicates de calcium Biodentine (BD) et BioRoot (BR) sur les cellules souches mésenchymateuses pulpaires (DPSC) *in vitro*. A cet effet, les cellules souches de pulpe dentaire ont été cultivées en présence ou non de chaque ciment préparé à 2 mg/mL. Deux types de contact ont été matérialisés: le contact « direct » et le contact « indirect ». Concernant le premier, le matériau est physiquement présent au contact des cellules ; alors que pour le second, il y a une barrière physique entre le matériau et les cellules testées.

Le premier objectif de ce travail a consisté à évaluer la morphologie, la prolifération, la migration ou encore l'adhérence *in vitro* des DPSC en présence des deux biomatériaux. De même, la cytotoxicité ainsi que la génotoxicité ont été évaluées.

Le second objectif a consisté à réaliser un marque immuno-histologique du cytosquelette et des molécules produites par la matrice extracellulaire, ainsi qu'une analyse génique du stress et de l'inflammation pouvant être liés à la présence des matériaux.

Le troisième objectif a consisté à caractériser le potentiel de biominéralisation des DPSC au contact des deux ciments après 10 jours ; seuls ou à l'aide de milieux inducteurs. Cette minéralisation a été mise en évidence histologiquement par une coloration à l'Alizarine Red S ; et une qRT-PCR a permis de réaliser une analyse plus approfondie de marqueurs minéralisant de types ostéogéniques et odontogéniques.

RESULTATS

Premièrement, dans le modèle en contact direct avec les cellules, les deux ciments à base de silicates de calcium ne stimulent pas la prolifération des cellules souches pulpaire après une semaine; ils semblent même la ralentir. Les cellules atteignent la confluence plus tardivement comparé à l'absence de matériau. Dans le modèle de contact indirect, la présence des deux matériaux ne semble pas modifier la prolifération. De plus, les deux ciments à base de silicates de calcium lors d'un contact direct avec les cellules semblent exercer un léger effet cytotoxique, contrairement au modèle indirect. Cependant, aucun effet génotoxique n'a été retrouvé dans les différentes conditions.

Deuxièmement, lors du test de cicatrisation ou migration cellulaire, les blessures créées dans les cultures en monocouches tardent à se refermer en présence des deux matériaux ; les cellules ayant tendance à se regrouper près de ceux-ci. L'immuno-histochimie a permis de montrer que les biomatériaux testés ne modifient pas ni ne désorganisent pas l'architecture cellulaire. Cependant, la sécrétion du collagène de type I et de la fibronectine, les deux principales molécules sécrétées dans la matrice extra-cellulaire (ECM) a semblé être altérée en présence des deux matériaux. L'analyse de l'expression des marqueurs IL-1 β et de la métalloprotéinase matricielle 9 (MMP-9) a permis de montrer qu'aucune réponse inflammatoire n'a été détectée dans les conditions testées.

Pour finir, l'étude des effets des ciments à base silicates de calcium sur le potentiel de biominéralisation des DPSC après 10 jours a permis de montrer que les cellules étaient en mesure de produire des nodules minéralisés en contact direct avec les matériaux; contrairement au contact indirect. Dans le modèle en contact direct, les matériaux ont tendance à diminuer l'expression des marqueurs ostéogénique examinés (ALP, COL1A1, OPN) alors que l'expression de Runx2 est restée inchangée. En revanche, l'expression de certains marqueurs odontoblastiques a été augmentée en contact direct avec les matériaux Biodentine et BioRoot RCS. La DSPP (Dentin Sialo Phosphoprotéine), qui a un rôle régulateur dans la minéralisation de la dentine réparatrice a été exprimée par les DPSC suite à l'association du contact direct de BioRoot RCS et un milieu minéralisateur ; contrairement à la Biodentine qui permet l'expression de la DSPP par un contact direct sans utilisation d'un milieu inducteur. Cette orientation vers un phénotype odontoblastique pourrait expliquer l'expression altérée du collagène de type 1 ainsi que de la fibronectine.

En conclusion, le nouveau matériau BioRoot RCS est biocompatible ; bien qu'il induise une diminution du taux de croissance des cellules. Comme la Biodentine auparavant, il induit une réponse cellulaire positive avec une biominéralisation par contact direct, même en l'absence de signaux chimiques. Ces résultats suggèrent donc que ce nouveau matériau peut être appliqué dans les cas où un ciment plus fluide que la Biodentine s'avère nécessaire. Toutefois, d'autres expériences *in vivo* devront être réalisées pour confirmer ces observations. On remarquera que ces matériaux semblent particulièrement adaptés aux phénomènes de dentine réactionnelle et réparatrice, en effet, ils n'induisent une minéralisation des cellules souches qu'en cas de contact direct. Ce dernier correspond à la réaction réparatrice alors que l'absence de différenciation des cellules en contact indirect correspond à notre attente clinique, en effet dans la dentine réactionnelle ce sont les odontoblastes qui doivent produire une matrice minéralisée et non les cellules souches.

ARTICLE

Article en soumission

***In vitro* effects of silicate based materials Biodentine and BioRoot RCS on dental pulp stem cells in reactionary and reparative dentinogenesis models.**

Loison-Robert LS^{1, 2}, Tassin M^{2*}, Bonte E^{1, 2*}, Berbar T², Isaac J^{2, 3}, Berdal A^{2, 3}, Simon S^{2, 3}, Fournier B^{2, 3}.

1-School of dentistry, Paris Descartes University, Sorbonne Paris Cité, France

2-Laboratory of Molecular Oral Pathophysiology, INSERM UMRS 1138, Cordeliers Research Center, 15 rue de l'école de médecine, Paris, F-75006, France; Paris Descartes; Pierre and Marie Curie; Paris Diderot Universities, Paris, F-75006, France.

3-Faculty of Dentistry, Paris Diderot University, Sorbonne Paris Cité, France

*- Both authors equally contributed to this work.

Corresponding author: Dr Benjamin Fournier, Laboratory of Molecular Oral Pathophysiology, Cordeliers Research Center, 15 rue de l'école de médecine, Paris, F-75006, email: ciyiben@gmail.com

Key Words

Biomaterials, Dental Pulp Stem Cells, Biocompatibility, Silicate based cements.

Conflicts of interest: Biodentine and BioRoot RCS samples were given by Septodont.

Acknowledgment

This work was supported by INSERM, Paris Diderot and Paris Descartes Universities. This work was also supported by the AFDS “Association Française pour le développement de la stomatologie”. We want to thank Legoff S. for his technical expertise with SEM. We thank the “Cytometry and Cell Image Center” of the Cordelier Research Center and especially C. Klein and H. Fohrer-Ting for their technical expertises. We thank DSHB for providing affordable antibodies: HFN 7.1 was deposited to the DSHB by Klebe, R.J. (DSHB Hybridoma Product HFN 7.1); 3CB2 was deposited to the DSHB by De La Rosa, E.J. (DSHB Hybridoma Product 3CB2).

ABSTRACT

Calcium silicate-based cement is a calcium silicate biomaterial with calcium oxide and carbonate filler additives. This biomaterial mechanical properties are close to that of dentin and may be used for restorative dentistry and endodontics. The aim of this study was to evaluate the *in vitro* biological effects of two calcium silicate cements, Biodentine (BD) and Bioroot (BR) on dental stem cells in a direct or indirect contact model. Originality of this study is the use of an interposed thin membrane to compare and assess effects of the diffusible components from materials and mimic tertiary dentinogenesis. The two used models aimed to mimic reactionary dentin formation (indirect contact) and reparative dentin formation (direct contact).

Dental pulp stem cells were cultured with or without two calcium silicate cements at a 2 mg/mL concentration. Cell proliferation and cytotoxicity were studied using MTT. Indirect contact was studied through a 2% agarose gel which lied above cells. For cell adhesion assay, biomaterials were observed with scanning electron microscope. Scratch assays allowed us to study cell motility. Bio-mineralization induction was evaluated using Alizarin Red S staining after 10 days while RT-qPCR (quantitative real-time reverse-transcriptase polymerase chain) was used for further analysis of the mRNA expression of osteogenic and odontogenic differentiation markers.

The effects of the two biomaterials were compared and did not modify DPSC proliferation at 2mg/mL. Direct exposure and indirect contact through an agarose membrane were also compared. BD and BR showed no cytotoxicity in direct contact compared with indirect contact although few cell deaths occurred in direct contact. However, no apoptosis nor inflammation induction were observed. A striking increase of mineralization induction was observed in presence of BD and BR. This effect was clearly more observed in direct contact as illustrated by alizarin Red S staining. Surprisingly, mineralization medium was not needed to observe biomineralization. This differentiation was concomitant with the expression of odontoblasts associated genes expression. Indirect contact exposures did not reproduce the induction to such a level.

These two biomaterials seem bioactive and biocompatible, with DPSC proliferation, migration and adhesion abilities preservation. The mineralization induction in direct contact let us think that these materials may have clinical indications in the dentin-pulp complex regeneration.

INTRODUCTION

Dentistry (restorative, endodontics or prosthodontics) aims to conserve and to protect teeth integrity and the bone surrounding teeth. A mean to do so is to prevent exposure of the dentin-pulp complex. Schematically, teeth are composed of two protective layers of mineralized hard tissues, enamel and dentin, surrounding a loose connective tissue, the pulp. Keeping pulp vitality is a priority, because less a tooth is restored; longer it will be functional. In this sense, once the pulp is exposed to oral cavity, a sealing is required.

Dental pulp tissue is easily exposed to cell death risk through various circumstances such as dental caries, trauma and operative dental procedures. These induce tertiary dentinogenesis needed to keep pulp vitality [1]. Two types are well described in literature. Reactionary dentinogenesis is the process whereby dentin is secreted in response to a local stimulus that reactivates the resting odontoblasts [2]. Reparative dentinogenesis occurs when odontoblast cells die, thus initiating a complex regenerative process that allows the formation of reparative dentin following recruitment of progenitor cells, their differentiation into odontoblast-like cells [1, 3]. Human Dental Pulp Stem Cells (DPSC) share the same embryologic origin than odontoblast, are able to self-renew and to differentiate toward several lineages [4]. One of the most striking features for dental tissue engineering applications is their odontogenic potential [3]. DPSC play an important role in the healing process through odontoblast-like cell differentiation. Thus, DPSC provide an excellent model for studying the *in vitro* biological effects of biomaterials on tertiary dentinogenesis.

Actually, biomaterials should be biocompatible, bioactive and able to fill and restore a tooth. The use of hydraulic cements [5] in dentistry have become much popularized to protect the dentin-pulp complex. Tricalcium silicate-based cements, like Biodentine™ (BD) (Septodont, Saint Maur des fossés, France), have recently been commercialized and have a wide range of applications including pulpotomy, pulp capping and endodontic repair (root perforations, apexification, resorptive lesions, and retrograde filling material in endodontic surgery) [6]. In that context, new hydraulic cement, BioRoot RCS (BR) was recently commercialized as mineral root canal sealer. And to date, only two studies have in part investigated this material *in vitro* [7, 8] and never compared it with BD, nor studied its effects on DPSC. The use of BD in direct pulp contact showed a complete dentinal bridge formation and an absence of inflammatory pulp response. Zanini also evaluated the biological effect of BD on a murine pulp cells line (OD-21) by analyzing the expression of several biomolecular markers after culturing OD-21 cells with or without BD [9]. Their results, consistent with

other studies evidenced that BD is bioactive due to its ability to stimulate OD-21 cell proliferation and biomineralization [10]. BD may be used as dentine substitute in several clinical indications. Investigating its interactions with the pulp cells demonstrated its biocompatibility and its ability to induce odontoblast differentiation and mineralization in cultured pulp cells [11]. However, the effect of BR on the differentiation of pulp cells to odontoblast-like cells has not been fully investigated.

As effect of BR has never been examined on human dental pulp stem cells, the purpose of this study was: 1- to evaluate the *in vitro* response of DPSC in terms of morphology, proliferation, migration, adhesion, biocompatibility and secretion molecules of this new hydraulic cement in contact with DPSC; 2- to investigate the mineralization induction. Moreover, the BD and BR materials have to be placed in direct contact with the periodontium or with pulp tissue to promote reparative dentinogenesis. Originality of this study is the use of an interposed thin membrane to assess effects of the diffusible components from materials and mimic reactionary dentinogenesis. No previous studies have investigated the effects of indirect contact of these materials BD and BR through a membrane; as could be made with other materials [12]. Thus, the effectiveness of the two materials when placed in direct contact with the DPSC versus the effectiveness of them when placed above a thin gel is studied. This will help to determine if direct contact of the cells with materials is necessary or if they are capable of releasing soluble factors, which, in turn, would influence cell fate.

MATERIALS & METHODS

Cell isolation and culture

Stem cells were extracted from human dental pulp tissue. Patients were not suffering from systemic pathology, oral infection or diseases; and gave their informed consents according to the Helsinki Declaration (1975). Pulp tissue was obtained following extraction of impacted third molars for orthodontic reason as already described (Gronthos et al., 2000). Cells were seeded and routinely maintained in the classical Low Glucose Dulbecco's modified eagle medium (DMEM 1X)-GlutaMAX™(Gibco®) containing 10% heat-inactivated Fetal Bovine Serum (FBS), 1% non-essential amino acids MEM 100X (Gibco®), 1% Penicillin-Streptomycin (10,000 U/mL) (Gibco®) and 0,5% Fungizone® Antimycotic(Gibco®) and 50

$\mu\text{g/mL}$ 2-Phospho-L-ascorbic acid trisodium salt (Sigma-Aldrich) at 37°C in humidified 5% CO_2 incubator.

Preparation of silicate cement solutions

Biodentine™ and BioRoot RCS, were prepared according to the manufacturers' instructions under aseptic conditions and transformed in powder by grinding in cold conditions (-20°C) and sterilized by dry heat.

Basal medium with no red phenol

The basal medium for materials was the DMEM without red phenol containing 10% FBS, 1% non-essential amino acids MEM 100X (Gibco®), 1% Penicillin-Streptomycin (10,000 U/mL) (Gibco®), 0,5% Fungizone® (Gibco®) and $50 \mu\text{g/mL}$ 2-Phospho-L-ascorbic acid trisodium salt (Sigma-Aldrich).

Biomaterial stock solutions

The grinded powder was added to the basal medium to prepare stock solutions of 10 mg/mL for each material and vortexed. A final concentration of 2 mg/mL for each calcium silicate cement, was used.

Scanning Electron Microscopy

First, calcium silicate cements powder before and after preparations according to the manufacturers' instructions were added on coverslips, fixed and examined using SEM. Moreover, DPSC were seeded on 0.2% gelatin coated-coverslips at a density of $30 \cdot 10^3$ cells per well in a 24-well plates during 7 days. The cells were allowed to adhere for 2 h in $800 \mu\text{L}$ of basal solution. Then, $200 \mu\text{L}$ of biomaterial stock solution was added and the basal medium was changed every 3 days. Coverslips were fixed with 4% paraformaldehyde / 5% sucrose solution then in 2.5% glutaraldehyde. After rinsing, coverslips were incubated with 0.5 % osmium tetroxide for 60 min followed by dehydration in specific grade alcohol, attached on sample holders and then coated with gold. The samples were examined using SEM. Microphotographs were taken with magnifications x400, x1000, x2000 and x5000.

Indirect contact model

To design an *in vitro* **model of mimicking reactionary dentin**, we spread cells and separated them from materials by a gel from a 2% agarose, low gelling temperature solution.

Direct and indirect cell contact proliferation assays

The rate of proliferation was estimated by performing MTT analysis on day 0, 1, 5 and 8, respectively.

Cell proliferation was also investigated using antibody Ki67 and nuclear DAPI staining (see below). Proliferation indexes were assessed by determining the total number of cells stained positively for Ki67 divided by the total number of DAPI stained nuclei.

FACS analysis

Cells were detached using 0.02% Trypsin/EDTA solution in phosphate buffered saline (PBS) and collected (5 min at 300g), washed in 3% FBS in PBS at 4°C, then incubated in solutions of Annexin V and 7-AAD in 3% BSA in PBS for 60 min at room temperature. Cells were then washed 3 times by centrifugation at 400 g for 5 min and were suspended in 3% FBS.

Cell viability assay

To assess cell viability, cells were cultured during 24 hours with the biomaterials and 30 min in the presence of CellTraceCalcein Red-Orange AM (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) as indicated by the supplier. Samples were observed and digital images recorded using a Zeiss microscope equipped with a digital camera.

pH measurements

Soaking solutions, media from proliferation assay, were discarded and collected after 24h, 5 and 8 days and measured using a pH meter (Hanna Instruments pH 210 microprocessor pH meters) previously calibrated. The electrode was inserted into the soaking solutions at room temperature (24 °C) and each measurement was repeated three times. The mean pH was then plotted with recording time.

Direct and indirect cell contact cytotoxicity assays and genotoxicity

For cell cytotoxicity assays, cells were studied at confluency. Medium was removed at day 0. For direct contact, 800µL of basal solution and 200µL of material stock solution was directly added. For indirect contact, 200µL of 2% agarose low gelling temperature solution was placed on the cells during 1 h at 37°C to jelly. Then 800µL of basal solution and 200µL of material stock solution was added. 1 mL of basal solution without material served as control. The absorbance was estimated by performing MTT assay on day 0, 1, 5 and 8, as described above.

Cell apoptosis and death was evaluated by Biotium Kit (Annexin V – Propidium Iodide) as indicated by the supplier.

For cell genotoxicity assays, cells were studied after 7 days in contact with materials. Coated coverslips cultures were fixed using PBS (pH 7.4) containing 4% paraformaldehyde / 5% sucrose for 10 min, rinsed three times in PBS and were permeabilized using 0.25% Triton X-100 for 15 min at RT. To block nonspecific staining, cells were treated with PBS containing 1% BSA/1‰ glycine at 37°C for 30 minutes. Samples were then incubated with 1/1000 pH2AX antibody at 37°C for 1 h. Samples were then incubated with Alexa Fluor® 555 goat anti-mouse IgG (H+L) at 37°C for 30 minutes. Cell nuclei were stained using Hoechst 33342.

Wound healing assay

Approximately $30 \cdot 10^3$ cells per well in triplicate in a 24-well plate were seeded. When complete confluence monolayer obtained, cells were incubated for 24 h in media without FBS to synchronize cells. Then a scratch was performed through the confluent cell monolayer with a 200 ml pipette tip. After wounding, cells were washed with PBS to remove cell debris and then incubated by direct contact with 800µL of basal solution and 200µL of material stock solution for 24 h, 48 h and 7 days. 1 mL of basal solution served as control. Microphotographs were taken after scratching. The cultured cells were observed with a Zeiss microscope equipped with a digital camera. Scratch-wound closure rate was determined using ImageJ software and the shortest distance between cells that had migrated into the wounded region and their respective starting points were determined.

Immunohistochemistry

After 7 days in contact with materials, coated coverslips cultures were fixed using phosphate buffered saline (PBS; pH 7.4) containing 4% paraformaldehyde / 5% sucrose for 10 min. For detection of intracellular molecules, coverslips cultures were permeabilized using 0.5% Triton X-100. To block background staining, cells were treated with PBS containing 1% BSA/1‰ glycine at 37°C for 20 minutes. Samples were incubated with the primary antibody at 4°C overnight or at 37°C for 2 h. For double immunostaining, primary antibodies were incubated as above. Samples were then incubated with the appropriate secondary antibodies at 37°C for 1 h. Cell nuclei were stained using DAPI.

The antibodies used for immunostaining were: 1/100 monoclonal anti-fibronectin (Sigma-Aldrich) and HFN 7.1 (which was deposited to the DSHB by Klebe, R.J. (DSHB Hybridoma

Product HFN 7.1)), 1/150 anti-collagen I (ab292; Abcam), anti-Ki67 (ab15580; Abcam), 1/50 monoclonal anti-vimentin (3CB2 was deposited to the DSHB by De La Rosa, E.J. (DSHB Hybridoma Product 3CB2)), 1/50 rat monoclonal anti-tubulin (Abcam, ab6160). Secondary antibodies were Alexafluor 488-conjugated goat anti-rabbit, Alexafluor 594-conjugated goat anti-mouse, Alexafluor 594-conjugated goat anti-rat, Alexafluor546-conjugated goat anti-mouse and Alexafluor488-conjugated goat anti-mouse (Life Technologies Corporation). Samples were observed using a Zeiss microscope equipped with a digital camera.

***In vitro* mineralization assay**

For the induction of mineralization, DPSC cultures were seeded in 24-well plates at a density of $30 \cdot 10^3$ cells per well and 6-well plate for RNA at a density of $100 \cdot 10^3$ cells per well. At 80% confluency, DPSC were induced for differentiation assays. Three media were used, with or without the two materials, in direct or indirect contact (Table 1). The cells were cultured for a total of 10 days and the differentiation media were changed every 3–4 days.

For the assessment of *in vitro* mineralization, cells were washed twice with PBS and fixed using PBS containing 4% paraformaldehyde / 5% sucrose for 15 min at 4°C. Then, cells were washed with deionized H₂O (dH₂O) and stained with 1% AR-S (Sigma–Aldrich) (pH 4.2) for 30 min at RT. Cells were then rinsed three times with dH₂O to reduce non-specific staining. Mineralized nodules were visualized and photographed using a Zeiss microscope equipped with a digital camera. Quantification of the staining was performed by method described by Gregory et al. (Gregory, Gunn, Peister, & Prockop, 2004). Experiments were performed in triplicate wells and repeated at least three times.

Analysis of mRNA expression by qRT-PCR

RNA was extracted from cultured using Tri Reagent solution (Molecular Research Center) according to the manufacturer's protocol. RNA concentration and purity were evaluated by spectrophotometry (Nanodrop, Thermo Scientific, Wilmington, MA, USA). Total RNA concentration and purity was measured and samples with OD_{260/280} ratio above 1.8 were used for the study. cDNA was synthesized using the Superscript II kit (Invitrogen, France) according to the manufacturer's instructions. All primers were designed on the boundaries of exons when possible, and analyzed by BLASTn software (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) for specificity and DNafold for secondary structures. For the qRT-PCR reactions, diluted RT products were mixed with 7.5 µL of 2X Kapa SYBR

Fast qPCR (KapaBiosystems, Wilmington, MA, USA) mix and 5 pmoles primers, for a final volume of 15 μ L. Real-time PCR amplification was performed on the CFX96 System (Bio-Rad Laboratories) using the following program: one cycle at 94°C for 3 min, 35 cycles at 95°C for 5 s, gene-specific annealing for 20 s, and reaction completion with reading plate and a melt curve analysis from 65°C to 95°C, 5 s for each 0.5°C. Amplification reactions were conducted for target genes with succinate dehydrogenase complex subunit A flavoprotein (SDHA), ubiquitin C (UBC) as reference genes. Non-transcribed RNA samples and a water control were used as negative controls. The PCR reactions were performed in triplicate for each sample. Gene expression analysis was performed using three parallel cell lines. The data was analyzed based on the comparative $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method (CFX Manager Software Version 2.1, Bio-Rad Laboratories). For primer sequences, see Table 2. In a set of experiments, the PCR products were also run on agarose gels (1.5%) to confirm the correct amplicon size.

Statistical analysis

Statistical analysis was performed using two-way ANOVA (Dunn test) and was carried out using Prism GraphPad 5 software (GraphPad Software Inc, La Jolla, CA, USA). Results are presented as mean \pm standard deviation (SD). Results were considered significant with a *p* value <0.05 . (on graphs *: $p<0.05$; **: $p<0.01$; ***: $p<0.001$; ****: $p<0.0001$).

RESULTS

EXAMINATION OF BIOMATERIALS AND CELL MORPHOLOGY

According to the manufacturer, BD and BR were of broadly similar chemical composition. However, they were different after preparation: BD had a yellow color while BR was white. In addition, BR consistency was more fluid and the working time was longer. SEM microphotographs showed different shapes of the powder particles: BD seemed to be cubic while BR was round (FIG. 1A, D). After preparation, granules and small crystals appeared on the surface (FIG. 1B, C, E, F). SEM examination after 7 days of cell culture revealed morphologic changes and a cellular affinity for the materials, but no differences between the two silicate surfaces were observed. The cells seemed more elongated, narrow (FIG. 1I-L) compared to the pulp stem cells without materials (DPSC) (FIG. 1G, H). The adhesion of cells on the material was difficult to assess because the material was neither

regular nor plane. Intimate contact was observed between the DPSC and particulate powder of BD and BR. Some cells appeared to have attached powder particles on their surfaces (FIG. 1G-L).

GROWTH CHARACTERISTICS

To compare influence of a physical contact, we elaborated an *in vitro* model of indirect contact between cells and materials, cells being separated by a 2% agarose gel (FIG. 2A, D). Then, a proliferation assay was carried out in direct or indirect contact with the two materials. Differences in growth rates of DPSC cultures with or without materials were observed. In direct or indirect contact, proliferation kinetics seemed the same between the materials and the control; greatest proliferation was obtained at day 8 compared to day 0 (Except BD in indirect contact) (FIG. 2B, E). In direct contact of BD and BR, cells proliferated slower than the cells alone. On the other hand, in presence of materials, DPSC needed more days to reach confluency. At day 8, BD and BR Ki-67 indexes differed from the control culture; this confirmed that the cells were not confluent and kept on proliferating (FIG. 2F). Thus, after one week, phase contrast microscopy revealed that the cells in direct contact with the materials were non confluent unlike control DPSC (FIG. 2 G-I). We might think that the 2 hydraulic cements reduce the space available for cell proliferation. But in indirect contact, cells had more spaces and we observed the same phenomenon. So, we concluded that the direct or indirect presence of the two materials reduced the proliferation rate of DPSC by increasing the cell doubling time.

pH MEASUREMENTS

In solution in the classical medium, pH values with materials were initially 12.24 for BD and decreased up to 8.18 (+/- 0.8) at 24h and these values then remained stable until 8 days. Concerning BR pH values varied from 9, 63 to 8,35 (+/- 0,7) during 8 days (FIG. 2C). No differences between direct and indirect contact pH values were observed (Data not shown).

VIABILITY, APOPTOSIS and CELL DEATH

To assess whether hydraulic cements caused changes in cell viability or apoptosis, cells were incubated for one week in contact with biomaterials at 70% of confluency. Calcein-AM fluorescence revealed that most of the cells in contact with biomaterials were alive (FIG. 3B, C) like the control cells (FIG. 3A). However, 7-amino-actinomycin D (7-AAD) staining showed presence of non-viable cells in flow cytometry analysis increased as compared to

control cells: 7,16% for BD, 5,81% for BR and 2,47% for DPSC (FIG. 3D). We assessed apoptosis through the use of Annexin V in flow cytometric analysis. No detectable apoptosis was observed in culture after contact with biomaterials like in the control (FIG. 3E).

CYTOTOXICITY and GENOTOXICITY

To further analyze cytotoxicity, we performed MTT assay on confluent cells exposed to the biomaterials for 8 days in direct or indirect contact. In this study, confluent cells characterized by a very low proliferative rate, were used to reproduce the in vivo condition of tissues in the absence of any cellular damage. In direct contact in the presence of the two materials, we observed a progressive loss of cell numbers at days 5 and 8 (FIG. 3F). Moreover, when comparing these with the cells alone, we observed that the materials induced a significantly decrease in MTT absorbance at day 8, meaning that less cells were obtained (FIG. 3F). To understand if direct contact or diffusion would be involved, we reproduced the same experiment in indirect contact. In this condition, no significant difference was observed at day 8 (FIG. 3G). So, a prolonged physical contact might cause cellular death or a proliferation rate decrease as we didn't observe the increase in cell number on the 1st day of culture. This lack of proliferation might be linked with an available space decrease due to material particles on culture dishes. But in direct or indirect contact, while comparing the toxicity on cells during 8 days, it was found that there was no significant difference between these two materials BD and BR (FIG. 3F and G).

Genotoxicity was assessed using H2AX phosphorylation, which is induced when DNA double strands breaks occur. We did not detect significant positivity for H2AX phosphorylation in our experimental conditions (FIG. 3H-J), underlining the absence of genotoxicity of the assessed materials.

MIGRATION TEST

To explore the role of the two hydraulic cements on the migration motility in direct contact with DPSC, wound healing assay was performed. Cell movement at days 0, 1, 2 and 7 showed that the two biomaterials delayed the wound edges closure, compared with control (FIG. 4A, B and C). But after 2 days, no significant differences were observed between BD and BR (FIG. 4D). Moreover, Figure 4E showed that in presence of materials, cells seemed to be attracted by them (FIG. 4E), partly explaining the closure delay.

CYTOSKELETON AND EXTRA CELLULAR MATRIX

At day 7, the main actors of the cellular cytoskeleton actin, tubulin and vimentin were observed in direct contact with biomaterials by immunohistochemically and were not modified compared to control (FIG. 5A-F). Thus, the assessed biomaterials did not disrupt nor disorganize cellular architecture which is necessary to cell basal functions. Type I collagen and fibronectin, the two main secreted molecules in extra-cellular matrix (ECM), consistently produced by DPSC, appeared altered in presence of the two materials (FIG. 5G, H, I and J). Fibronectin was more deeply decreased than type I Collagen (FIG. 5I and J).

OXIDATIVE STRESS AND INFLAMMATORY RESPONSE

First, total protein secretion (BCA) was not modified by biomaterials contact (FIG. 5K). Oxidative stress was described in response to active and harmful molecules. We, thus, studied expression of oxidative stress associated enzymes: Superoxide dismutase (SOD1), Glutathione synthase (GSS) and catalase by RT-qPCR. No significant difference was observed in any of the conditions (FIG. 5L-O). Moreover, cells did not express neither IL-1 β nor Matrix Metalloproteinase 9 (MMP-9) (data not shown) nor increased expression of Matrix metalloproteinase 2 (MMP-2) (FIG. 5O), generally associated with inflammatory response.

BIOMINERALIZATION

One of the key characteristics of BD is its ability to form a hydroxyapatite or apatite-like layer: this phenomenon is called biomineralization. This active capacity of the both cements silicate was compared with 3 media in direct or indirect contact after 10 days: classical medium (CTRL Medium), classical medium enriched in glycerol-phosphate (Medium 1) and osteogenic medium (Medium 2) (Table 1). Thus, to determine the mineralization effect of BD and BR on DPSC cultures, mineralized matrix deposition was examined using Alizarin Red S staining (FIG. 6A, C). First, in direct contact with BD and BR, cells mineralized with the three media (FIG. 6A). With indirect contact model, Figure 6 C showed no staining in all conditions, except on the edges of some wells. This is explained by poor tightness between the agarose gel and the cell culture allowing the material to go through. After 10 days of differentiation induction, calcium staining was quantified by spectrometry in direct and indirect contact (FIG. 6B and D). Calcium level was significantly higher in direct contact with the two cements silicate in Medium 2 (FIG. 6B). In control medium and medium 1, whether presence or absence of the source of organic phosphates in the culture medium or by indirect contact with cells; calcium staining was similar (FIG. 6B

and D). Moreover, expression of target mineralization markers after 10 days was studied in direct or indirect contact with dental cells.

Osteogenic markers ALP, Osteopontin, Runx2 X

ALP expression of DPSC was significantly downregulated in control medium after direct exposure to the two silicates BD and BR; there was no significant difference in the others conditions (FIG. 6E and F). Expression of Osteopontin (OPN) in DPSC was significantly increased after direct exposed to medium 2; and the presence of two silicates dramatically reduced this expression (FIG. 6G and H). Runx2 was unmodified in all conditions compared with control DPSC in control medium (FIG. 6I and J).

Odontogenic markers DLX5, MSX2, Nestin and DSPP

For DLX5, differences were only observed in indirect contact. DLX5 expression was increased in presence of BD in medium 1 compared to DPSC; and downregulated with BR in medium 2 compared to BR in control medium (FIG. 6K). Direct contact didn't reproduce these results (FIG. 6L). In indirect or direct condition, BR upregulated MSX2 expression compared to DPSC in control medium and reduced it in medium 2 compared to BR in control medium (FIG. 6M and N). In addition, direct presence of BR increased Nestin expression in control medium and downregulated it in mineralizing media (FIG. 6O and P). Last, in direct contact, DSPP expression was decreased in presence of mineralizing media in DPSC; but the BD presence in the same media amplified DSPP expression (FIG. 6Q and R).

DISCUSSION

Materials used in pulp repair must be biocompatible, because placed in direct contact with living tissue such as in pulp capping, perforation repair, or when used as root sealer. The use of hydraulic cements [5] in dentistry became much popularized to protect the dentin-pulp complex and restore the tooth integrity. BioRoot RCS (BR), a new calcium silicate-based cements which looks like BiodentineTM (BD) in composition, is designed to be placed in permanent and close contact with periodontal tissue. However, such cements used to give good results in conservative therapies. BR fluidity may be useful in such approaches. We thus wanted to challenge it with pulp cells. Inducing/allowing proliferation, migration, adhesion

and mineralization are essential qualities required by a biomaterial in the healing dentin process. The aims of this study were (1) to evaluate *in vitro* biological effects, responses and biomineralization capacity of new silicate cement BR on human dental pulp stem cells (hDPSC), (2) to determine whether these materials act on cells by direct or indirect contact with the use of an interposed thin membrane to assess effects of the diffusible components from materials and to mimic reactionary dentinogenesis.

Several publications studied the effectiveness and bioactivity of BD on the pulp tissue [6], but only two focused on BR [7, 8]. However, no previous studies have investigated the effects of direct contact of this material versus placing it away from the cells; as could be made with other materials [12] and even less with BR. To achieve direct or diffusion contact with the materials in that study, two calcium silicate cements were placed on the DPSC in the well plates for 7 days directly or above a thin agarose layer. This direct contact model conditions might mimic the environment wherein the material. We aimed to reflect the clinical conditions of direct pulp capping in which the contact between pulp cells and materials occurred indirectly through blood clots and physiologic fluids or through dentin wall. The use of an interposed thin gel may only allow for the assessment of the effect of the materials diffusible components during reactionary dentinogenesis.

SEM examination of cell-seeded cements provided a visual confirmation of the interactions between the cells and the two cements after 7 days of culture. It is known that both surface chemistry and surface topography regulate cell behavior including cell adhesion, spreading, proliferation, and differentiation [13]. Cells showed a typical fibroblast shape. The presence of thin processes extending from one cell to another demonstrated the good cell interaction with the two cements and the presence of crystals on the surface seemed not to prevent cell adhesion.

During the aforementioned procedures, the material was in direct contact with the connective tissue and had the potential to affect proliferation, viability and migration of pulpal cells. Unlike other study [14] with the same material concentration, the two assessed hydraulic cements did not stimulate the proliferation of human pulp dental stem cells compared to control. In the present study, cells proliferated in direct contact with the two materials after several days, but reached a confluency later compared to control. A similar effect was observed in a previous study with immortalized murine pulp cells with an initial inhibitory effect on proliferation during the first 2 days when cells were exposed to BD followed by an increase in proliferation [9]. After 7 days, Ki67 index confirmed this

proliferation by direct contact. The non-confluence might be explained by the lack of space in cell development due to the grinded powder [15]. With the indirect contact model, the materials did not appear to influence the proliferation. Moreover, viability of cells exposed to calcium silicate cements showed no significant differences compared with the control conditions.

The cytotoxicity of endodontic cements is of great concern because irritation of the surrounding tissue may delay periapical healing. Methyl-thiazol tetrazolium (MTT) colorimetric assay is widely used as a standard assay for evaluating the cytotoxicity of new biomaterials and has been routinely used to test dental and endodontic filling materials in cell culture systems. Laurent tested the cytotoxic effects of BD on human pulp cell cultures, concluding an absence of toxicity for BD [11]. Direct contact of BD or BR exerted a cytotoxic effect even if limited contrary to indirect contact conditions where we did not evidence any. It should be noted that in this experiment, we placed materials directly in contact with the cell strains to simulate some *in vivo* conditions. Moreover, BR is as biocompatible as BD. None of experimental conditions revealed genotoxic effect as evaluated through H2AX phosphorylation [16].

Wound healing processes are divided into distinct phases that involve cell proliferation, adhesion and migration and are essential processes in tissue regeneration. A recently published article focused on the influence of BD on hDPSC showed that BD favorably affected healing when placed directly in contact with the pulp by enhancing the proliferation, migration, and adhesion of human dental pulp stem cells [14]. We didn't evidence modifications due to the materials in cell motility, but we observed a delayed closure. The cells aggregated along materials before closing the scratches which may reveal a tropism towards these cements. Culturing the cells above BD or BR would reveal some insights on their ability to migrate on such a substrate. Still, both materials allowed healing by proliferation and migration in cell scratch assays.

Many researchers have been suggested that the mechanism for the stimulation of repair by the deposition of mineralized tissue depends on the pH and the ability of the release of various ions including calcium ion [17]. This study showed that the two calcium silicate cements increase the pH of distilled water to alkaline levels upon storage. But in contact with cells the highly alkaline pH values of these materials returns to normal, certainly due to buffer

system (carbonate buffer in DMEM) similar to what may happen in real life (carbonate buffer in saliva).

Our study also evidenced biomaterials' impact on cell cytoskeleton and adversely affects the synthesis of the main extra-cellular matrix components. The two hydraulic cements did not disorganize the main actors of the DPSC cytoskeleton: actin microfilament, microtubule of tubulin and the vimentin intermediate filament. However, type I collagen and fibronectin, the two main secreted molecules in extra-cellular matrix (ECM), consistently produced by DPSC, appeared altered in presence of the two materials. *In vivo*, the pulp capped with BD showed complete dentinal bridge formation and an absence of inflammatory pulp response [18]. Molecules IL-1 β and Matrix metalloproteinase 9 (MMP-9) generally associated with inflammation of connective tissue cells were not expressed in presence of both materials. No oxidative stress was observed due to materials.

When dentin barrier is affected, a healing dentin process is initiated [19]. And, pulp stem cells are actively involved in dentin and pulp tissue regeneration [20]. Consequently, pulp stem cells have been used to test molecules used in restorative dentistry [21]. In addition to the biological properties described previously, another ideal characteristic of an endodontic/restorative material is biomineralization induction. Previous studies showed that BD treatment resulted in the odontogenic differentiation of DPSC [10]. However, in order to characterize the biomineralization obtained, a combination of different markers has to be used to conclude that a given cell has osteoblastic or odontoblastic characteristics. In our study, effects of the cements on the mineralization potential of hDPSC were evaluated using Alizarin red S staining and investigated at the mRNA level after 10 days.

First, after 10 days, cells were able to produce mineralized nodules in direct contact with the two calcium silicate cements. At the mRNA level, direct contact with both hydraulic cements downregulated the osteogenic gene markers examined (ALP, COL1A1, OPN), while Runx2 was unmodified. Results similar to those of Zanini were obtained with a decrease of ALP and COL1A1 [9]. By contrast, specific markers of odontoblastic expression of DPSC exposed to the hydraulic cements were expressed. Nestin and Msx2 were increased in direct contact with BR. DSPP, which has a regulatory role in the mineralization of reparative dentin [22], was expressed by DPSC in direct contact with BD. By contrast, BR needed mineralizing conditions, meaning phosphate ions like in a dentin environment to express DSPP. This

apparent differentiation toward an odontoblastic phenotype might explain the altered expression of type 1 Collagen and fibronectin.

In conclusion, this new biomaterial induces a decrease in cell growth rate and had a very limited cytotoxic effect with no genotoxicity. Like BD, it induced a positive cellular response with a biomineralization by direct contact, even in absence of chemical cues. These results therefore suggest that the biomaterial might be applied as a pulp capping material when a more fluid cement than BD is necessary. However, further *in vivo* experiments will be needed to confirm these observations.

REFERENCES

- [1] Smith AJ, Lesot H. Induction and regulation of crown dentinogenesis: embryonic events as a template for dental tissue repair? *Critical reviews in oral biology and medicine* : an official publication of the American Association of Oral Biologists. 2001;12:425-37.
- [2] Smith AJ, Cassidy N, Perry H, Begue-Kirn C, Ruch JV, Lesot H. Reactionary dentinogenesis. *The International journal of developmental biology*. 1995;39:273-80.
- [3] Alliot-Licht B, Bluteau G, Magne D, Lopez-Cazaux S, Lieubeau B, Daculsi G, et al. Dexamethasone stimulates differentiation of odontoblast-like cells in human dental pulp cultures. *Cell and tissue research*. 2005;321:391-400.
- [4] Gronthos S, Mankani M, Brahimi J, Robey PG, Shi S. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) *in vitro* and *in vivo*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2000;97:13625-30.
- [5] Prati C, Gandolfi MG. Calcium silicate bioactive cements: Biological perspectives and clinical applications. *Dental materials* : official publication of the Academy of Dental Materials. 2015;31:351-70.
- [6] Malkondu O, Karapinar Kazandag M, Kazazoglu E. A review on biodentine, a contemporary dentine replacement and repair material. *BioMed research international*. 2014;2014:160951.
- [7] Camps J, Jeanneau C, El Ayachi I, Laurent P, About I. Bioactivity of a Calcium Silicate-based Endodontic Cement (BioRoot RCS): Interactions with Human Periodontal Ligament Cells *In Vitro*. *Journal of endodontics*. 2015;41:1469-73.
- [8] Dimitrova-Nakov S, Uzunoglu E, Ardila-Osorio H, Baudry A, Richard G, Kellermann O, et al. *In vitro* bioactivity of Bioroot RCS, via A4 mouse pulpal stem cells. *Dental materials* : official publication of the Academy of Dental Materials. 2015;31:1290-7.
- [9] Zanini M, Sautier JM, Berdal A, Simon S. Biodentine induces immortalized murine pulp cell differentiation into odontoblast-like cells and stimulates biomineralization. *Journal of endodontics*. 2012;38:1220-6.

- [10] Chang SW, Lee SY, Ann HJ, Kum KY, Kim EC. Effects of calcium silicate endodontic cements on biocompatibility and mineralization-inducing potentials in human dental pulp cells. *Journal of endodontics*. 2014;40:1194-200.
- [11] Laurent P, Camps J, De Meo M, Dejou J, About I. Induction of specific cell responses to a Ca(3)SiO(5)-based posterior restorative material. *Dental materials : official publication of the Academy of Dental Materials*. 2008;24:1486-94.
- [12] Paranjpe A, Smoot T, Zhang H, Johnson JD. Direct contact with mineral trioxide aggregate activates and differentiates human dental pulp cells. *Journal of endodontics*. 2011;37:1691-5.
- [13] Gandolfi MG, Pagani S, Perut F, Ciapetti G, Baldini N, Mongiorgi R, et al. Innovative silicate-based cements for endodontics: a study of osteoblast-like cell response. *Journal of biomedical materials research Part A*. 2008;87:477-86.
- [14] Luo Z, Li D, Kohli MR, Yu Q, Kim S, He WX. Effect of Biodentine on the proliferation, migration and adhesion of human dental pulp stem cells. *Journal of dentistry*. 2014;42:490-7.
- [15] Fan C, Wang DA. Effects of permeability and living space on cell fate and neo-tissue development in hydrogel-based scaffolds: a study with cartilaginous model. *Macromolecular bioscience*. 2015;15:535-45.
- [16] Nikolova T, Dvorak M, Jung F, Adam I, Kramer E, Gerhold-Ay A, et al. The gammaH2AX assay for genotoxic and nongenotoxic agents: comparison of H2AX phosphorylation with cell death response. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology*. 2014;140:103-17.
- [17] Okabe T, Sakamoto M, Takeuchi H, Matsushima K. Effects of pH on mineralization ability of human dental pulp cells. *Journal of endodontics*. 2006;32:198-201.
- [18] Nowicka A, Lipski M, Parafiniuk M, Sporniak-Tutak K, Lichota D, Kosierkiewicz A, et al. Response of human dental pulp capped with biodentine and mineral trioxide aggregate. *Journal of endodontics*. 2013;39:743-7.
- [19] Stanley HR, Pereira JC, Spiegel E, Broom C, Schultz M. The detection and prevalence of reactive and physiologic sclerotic dentin, reparative dentin and dead tracts beneath various types of dental lesions according to tooth surface and age. *Journal of oral pathology*. 1983;12:257-89.
- [20] Simon SR, Berdal A, Cooper PR, Lumley PJ, Tomson PL, Smith AJ. Dentin-pulp complex regeneration: from lab to clinic. *Advances in dental research*. 2011;23:340-5.
- [21] Soares DG, Basso FG, Hebling J, de Souza Costa CA. Immediate and late analysis of dental pulp stem cells viability after indirect exposition to alternative in-office bleaching strategies. *Clinical oral investigations*. 2015;19:1013-20.
- [22] Chen S, Gluhak-Heinrich J, Wang YH, Wu YM, Chuang HH, Chen L, et al. Runx2, osx, and dspp in tooth development. *Journal of dental research*. 2009;88:904-9.

FIGURE LEGENDS:

Figure 1:

SEM pictures of BD and BR before (Fig1A and D) and after mixing (Fig1B, C, E and F). SEM observations at different magnifications (x400 Fig 1G, I, K and x1000 Fig 1H, J, L) of DPSC alone (G and H), in contact with BD (I and J) and in contact with BR (K and L).

Figure 2:

Schematic view of the direct (Fig2A) and indirect (Fig2B) experiments. Proliferation kinetics were followed using MTT assay in direct contact experiments (Fig2C) and indirect experiments (Fig2E). PH values were recorded (Fig2C) while ki-67 indexes were calculated after immunostainings (Fig2F). Pictures using inverted phase contrast microscope were performed at day 8 of culture of the DPSC alone (Fig2G), in contact with BD (Fig2H) or with BR (Fig2I).

Figure3:

Cell viability was assessed using Calcein-AM assay on DPSC without materials, in contact with BD and With BR (respectively Fig3A, B, C). Genotoxicity was evaluated using pH2AX immunostaining on the same conditions (Fig3D, E and F). Cell deaths were wounded using 7-AAD in flow cytometry (Fig3G) as well as apoptosis using Annexin-V (Fig3H). Cytotoxicity assay using MTT were performed on direct contact (Fig3I) and indirect contact conditions (Fig3J).

Figure 4:

Scratch assays were performed on DPSC (Fig4A), DPSC (Fig4B) with BD and with BR (Fig4C) and followed daily using a phase contrast microscope. Wound closure rates were evaluated using image analysis software, ImageJ (Fig4D). A higher magnification showed the close contact between cells and the biomaterials (Fig4E).

Figure 5:

Cytoskeleton and main extracellular matrix proteins were analysed through immunofluorescence. Actin was observed in DPSC (Fig5A), DPSC with BD (Fig5B) and in DPSC with BR (Fig5C); like vimentin and tubulin (Fig 5D, D and F); and type 1 collagen and fibronectin (Fig 5G, H and I). The observed decrease in type 1 collagen, when DPSC were in contact with biomaterials, was confirmed using RT-QPCR (Fig 5J) while protein secretion was not modified by the experimental conditions (Fig 5K).

Figure 6:

Pictures of the Alizarin Red S staining of the DPSC in the different direct contact conditions were taken using phase contrast microscope (Fig 6A) and the absorbance was measured to evaluate the mineralization degree (Fig6B). The same experiments were repeated on the indirect contact experiments (Fig 6C and D).

The osteodifferentiation genes expression was quantified using RT-QPCR (Fig 6E to H) while the odontogenic genes expression was also analysed (Fig6 M to P). For each analysis, a

representative agarose gel was run to verify the amplicons size. DSPP was analysed in direct (Fig 6Q) and indirect contact (Fig 6R) conditions by classical PCR since we did not obtain enough expression to perform QPCR analysis.

***In vitro* effects of silicate based materials Biodentine and BioRoot RCS on dental pulp stem cells in reactionary and reparative dentinogenesis models.**

Loison-Robert LS^{1, 2}, Tassin M^{2*}, Bonte E^{1, 2*}, Berbar T², Isaac J^{2,3}, Berdal A^{2,3}, Simon S^{2,3}, Fournier B^{2,3}.

1-School of dentistry, Paris Descartes University, Sorbonne Paris Cité, France

2-Laboratory of Molecular Oral Pathophysiology, INSERM UMRS 1138, Cordeliers Research Center, 15 rue de l'école de médecine, Paris, F-75006, France; Paris Descartes; Pierre and Marie Curie; Paris Diderot Universities, Paris, F-75006, France.

3-Faculty of Dentistry, Paris Diderot University, Sorbonne Paris Cité, France

*- Both authors equally contributed to this work.

Corresponding author: Dr Benjamin Fournier, Laboratory of Molecular Oral Pathophysiology, Cordeliers Research Center, 15 rue de l'école de médecine, Paris, F-75006, email: ciyiben@gmail.com

Key Words

Biomaterials, Dental Pulp Stem Cells, Biocompatibility, Silicate based cements.

Conflicts of interest: Biodentine and BioRoot RCS samples were given by Septodont.

Acknowledgment

This work was supported by INSERM, Paris Diderot and Paris Descartes Universities. This work was also supported by the AFDS "Association Française pour le développement de la stomatologie". We want to thank Legoff S. for his technical expertise with SEM. We thank the "Cytometry and Cell Image Center" of the Cordelier Research Center and especially C. Klein and H. Fohrer-Ting for their technical expertises. We thank DSHB for providing affordable antibodies: HFN 7.1 was deposited to the DSHB by Klebe, R.J. (DSHB Hybridoma Product HFN 7.1); 3CB2 was deposited to the DSHB by De La Rosa, E.J. (DSHB Hybridoma Product 3CB2).

Table 1. Media used for the study.

	Composition
<i>Classical medium</i>	DMEM low glucose + Antibiotics + 10% FBS + 1x AANE + 50µg/mL L2 phosphate ascorbic acid
<i>Medium 1</i>	Classical medium + 10mM betaglycerophosphate
<i>Medium 2</i>	Medium 1 + 10nM Dexamethasone

Figure 1

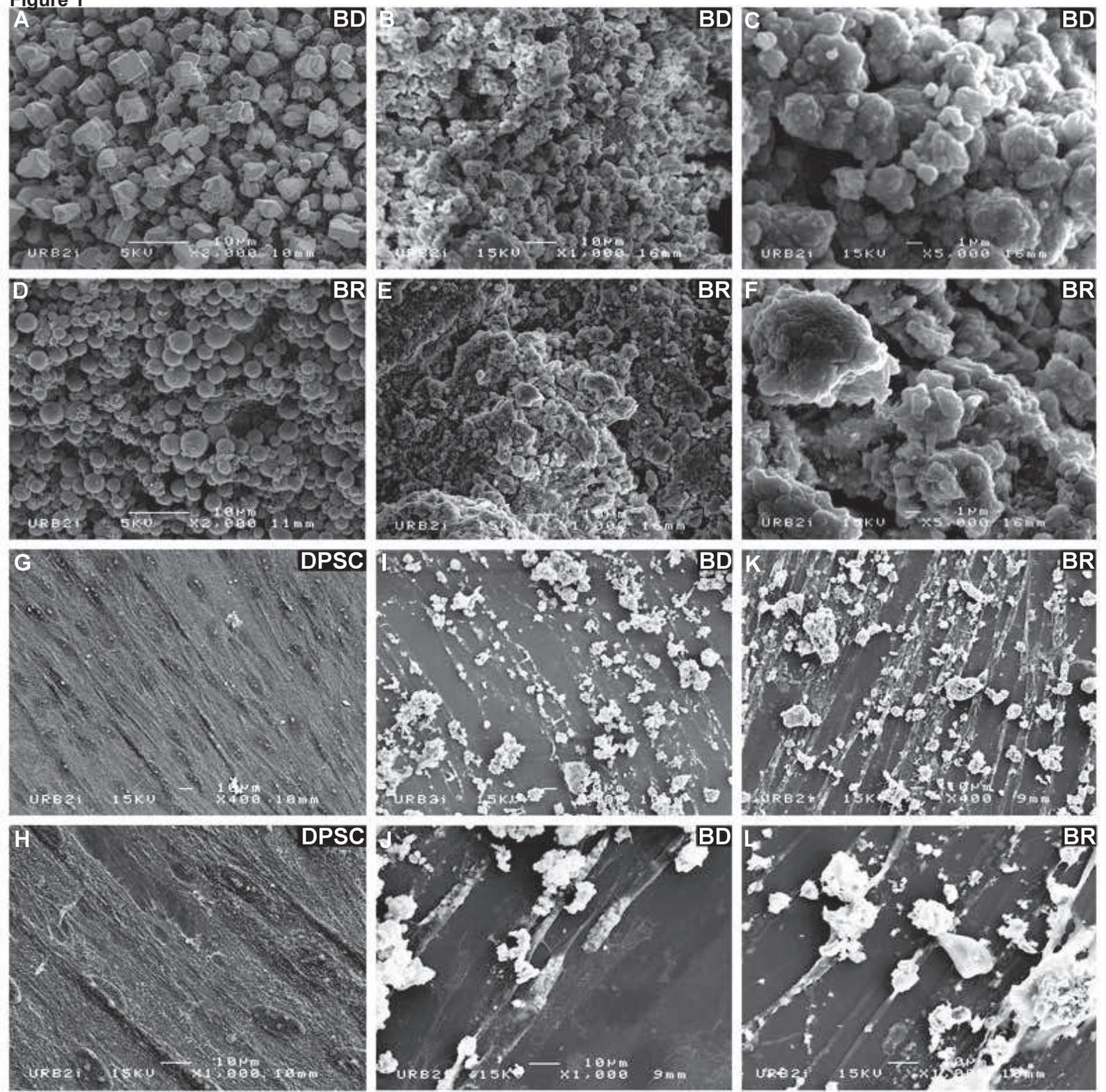


Figure 2

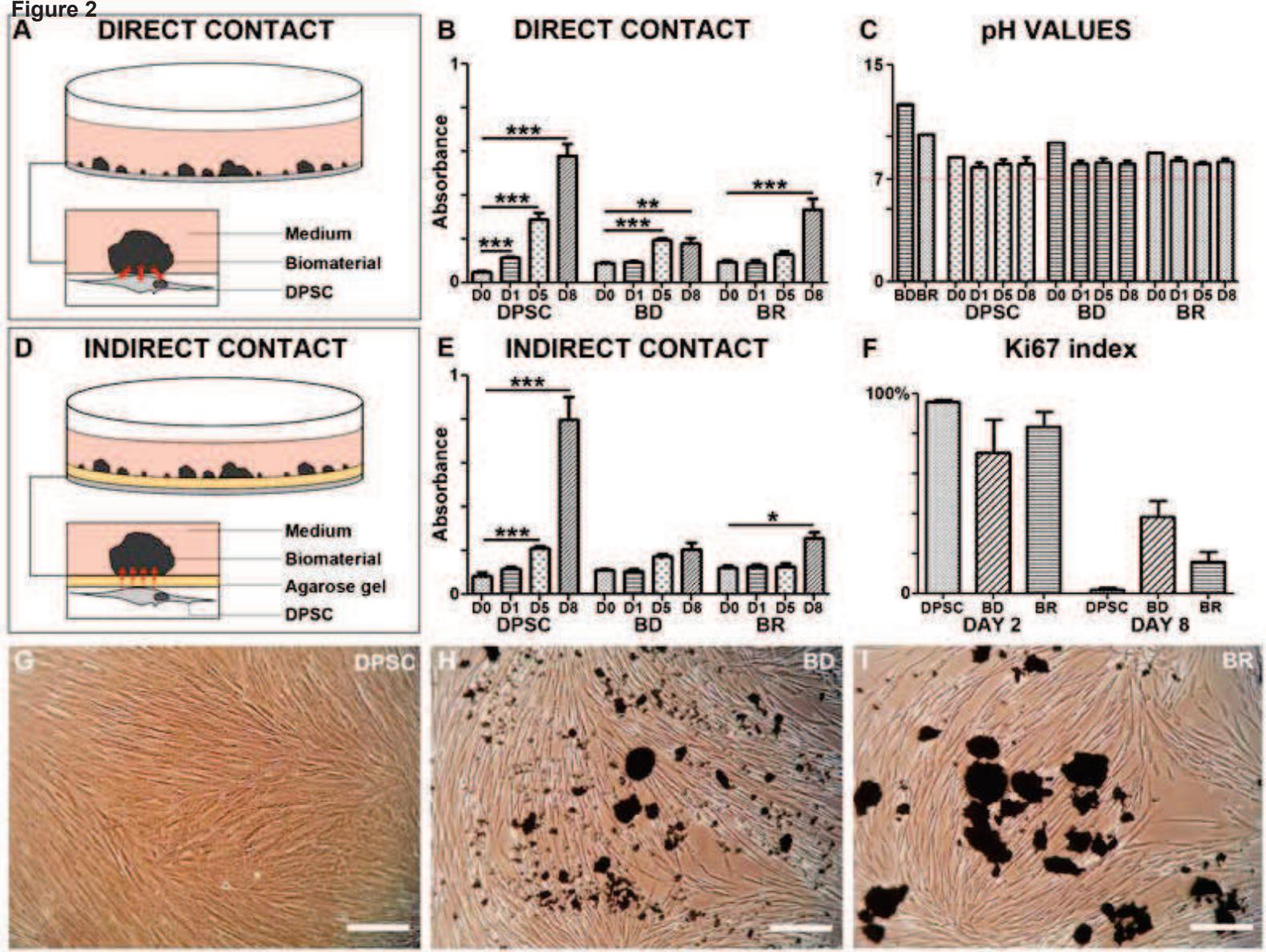
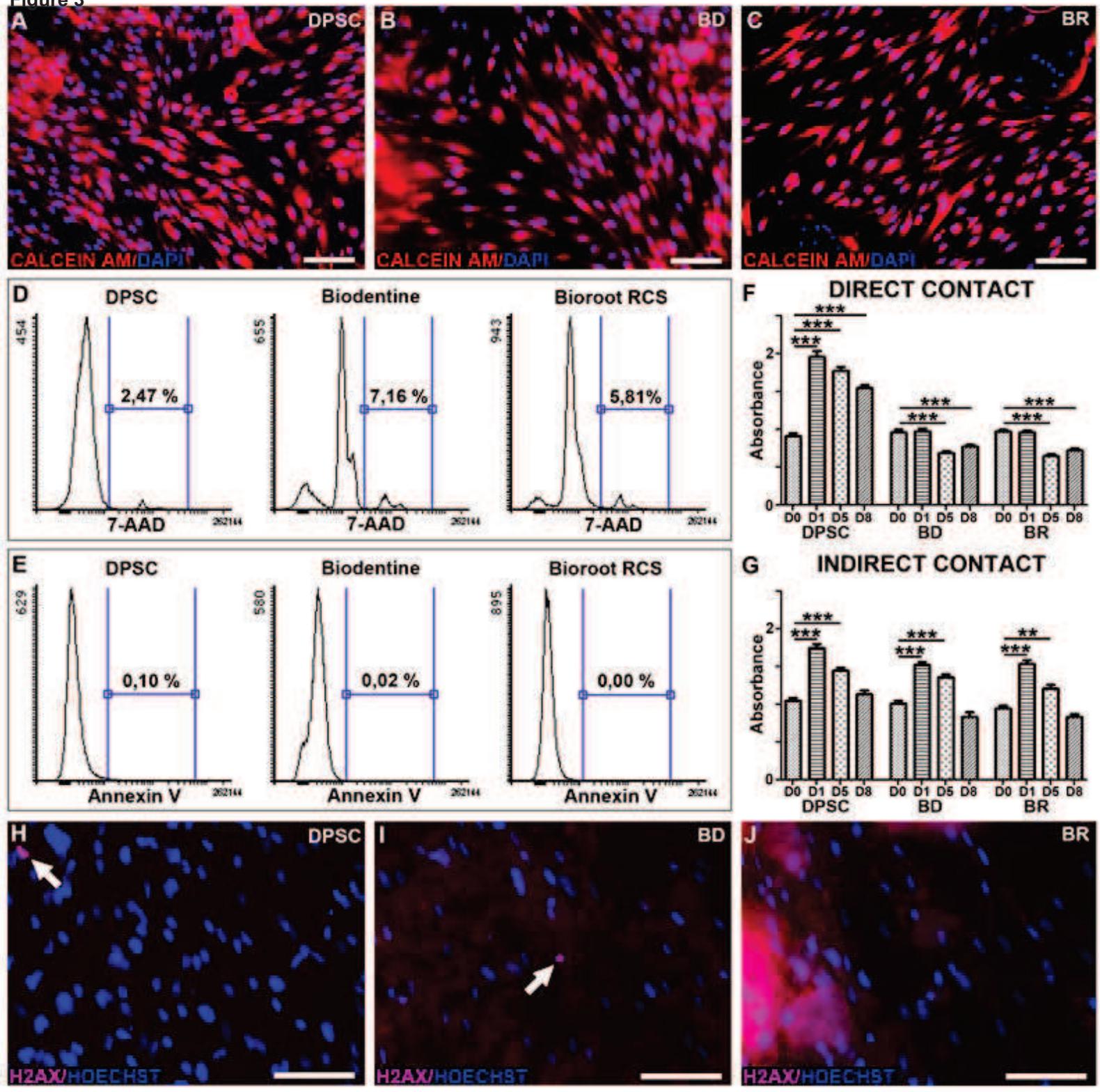


Figure 3



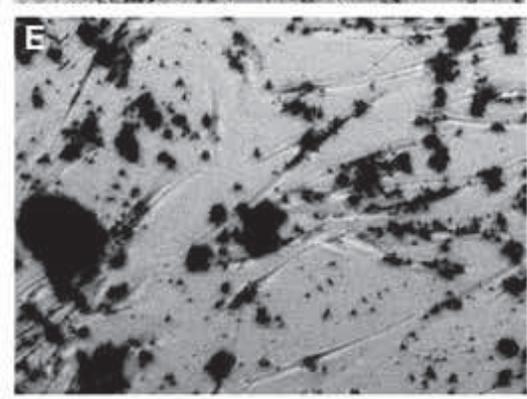
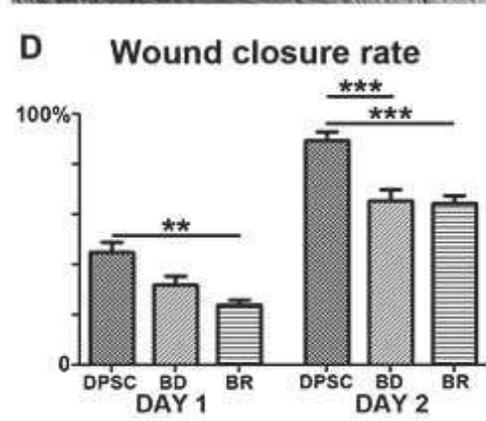
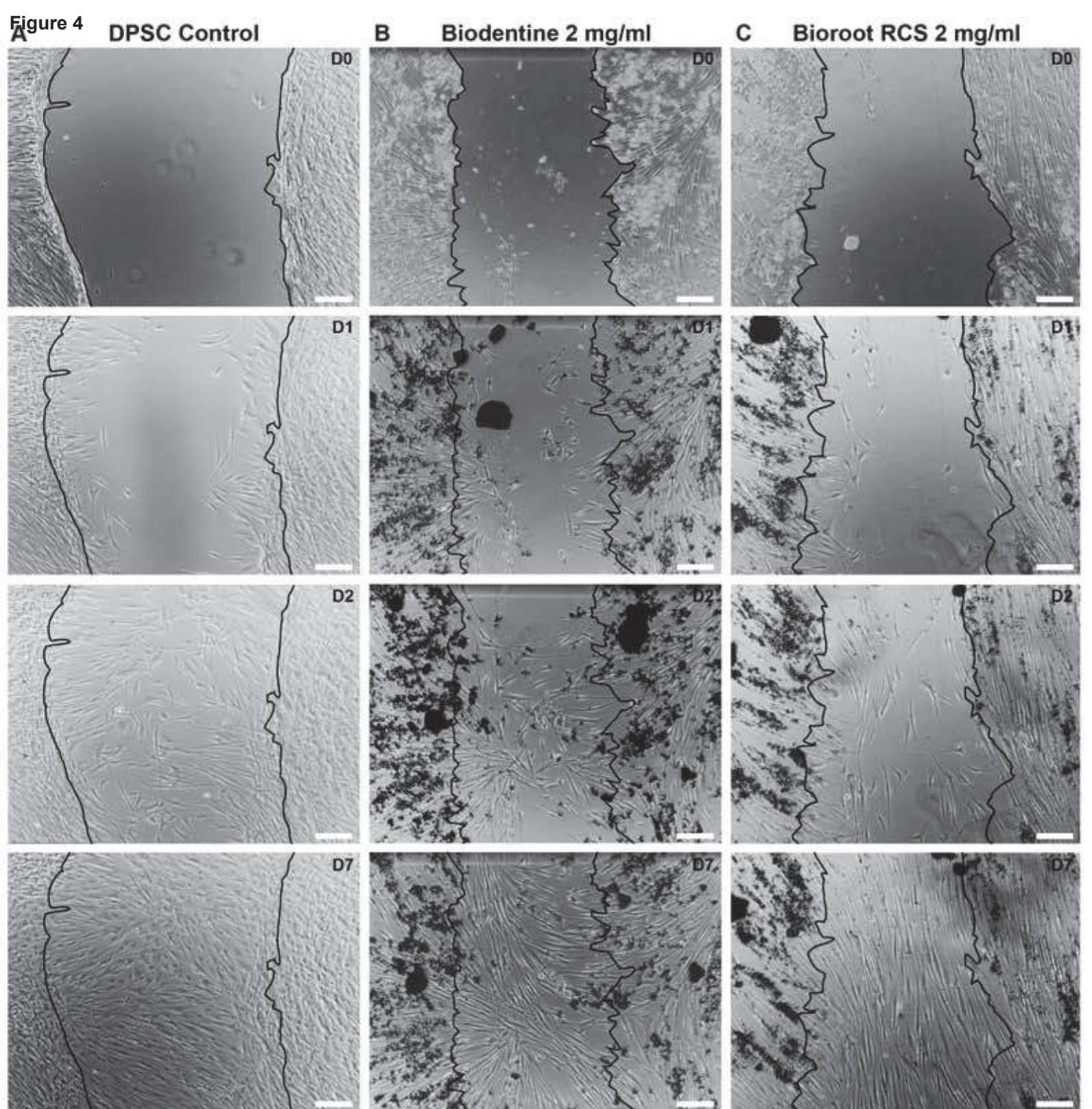


Figure 5 DPSC Control

Biodentine

Bioroot RCS

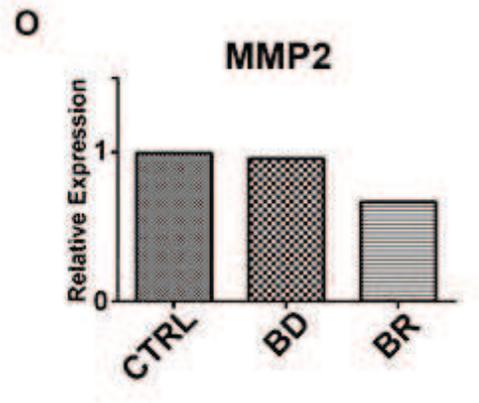
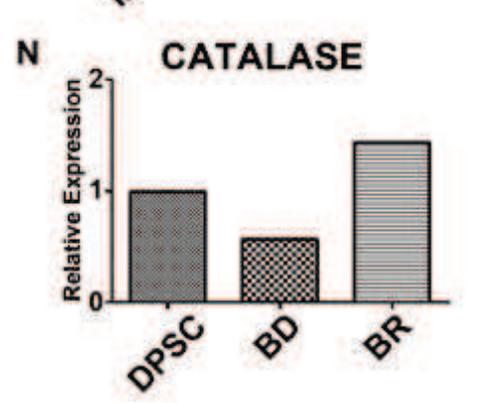
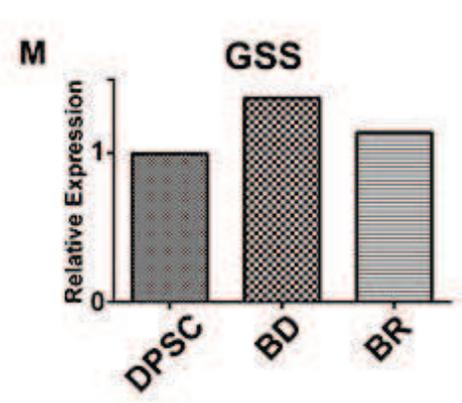
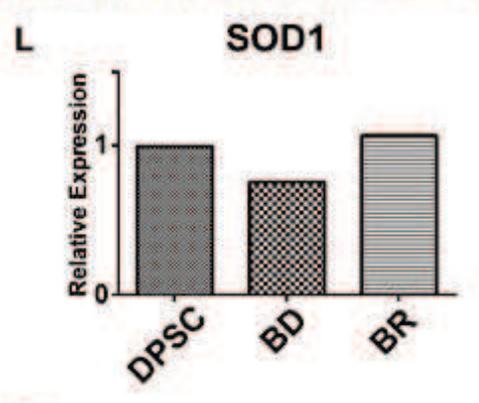
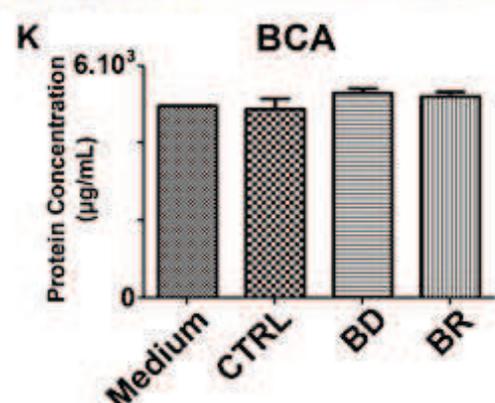
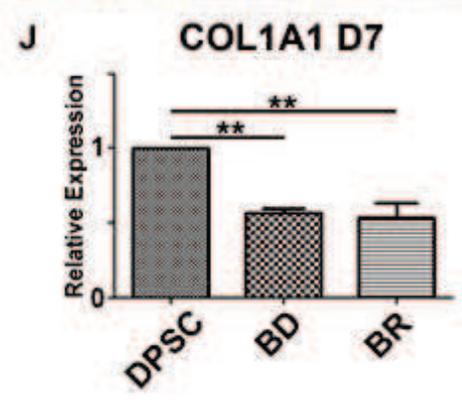
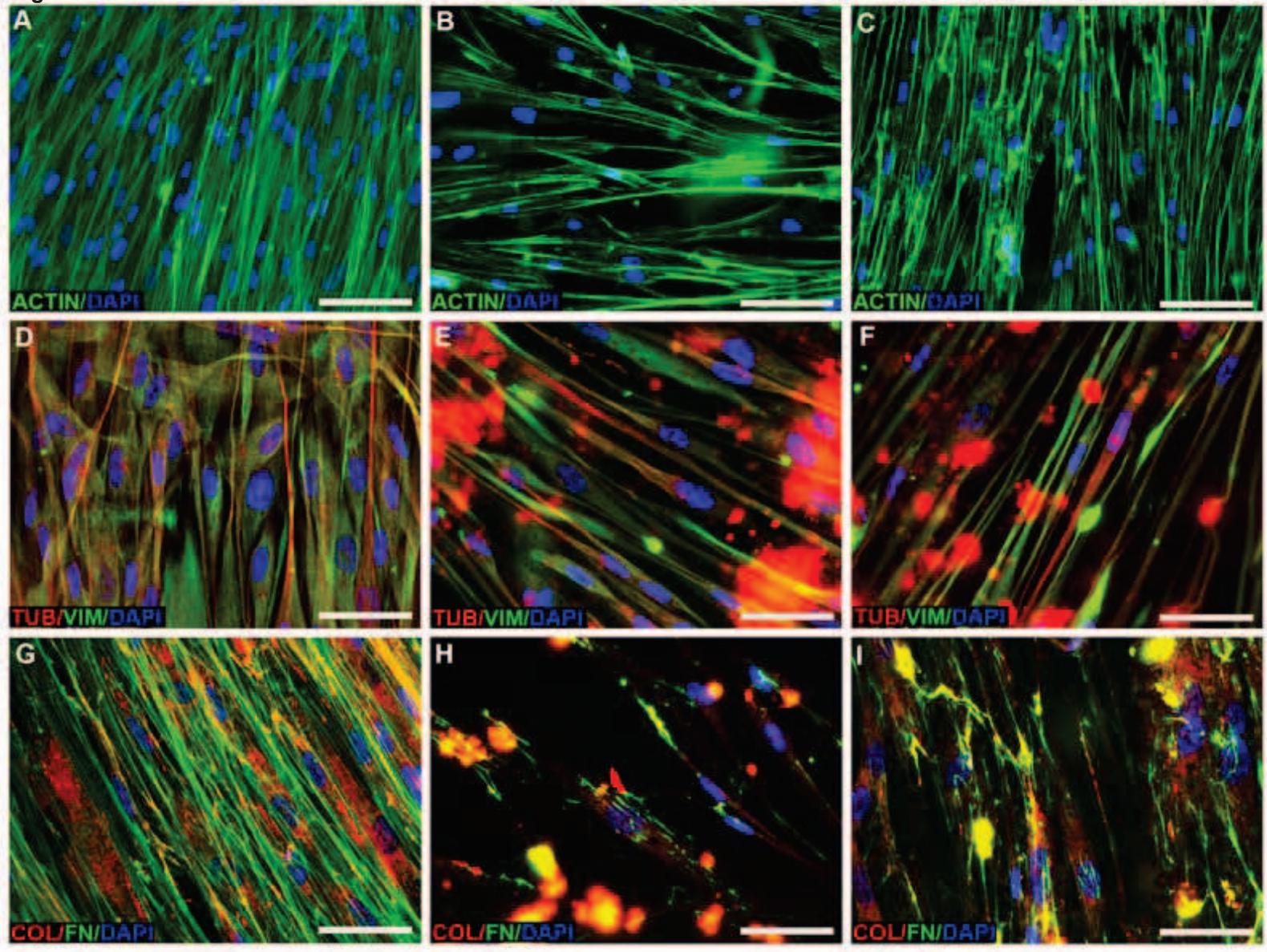
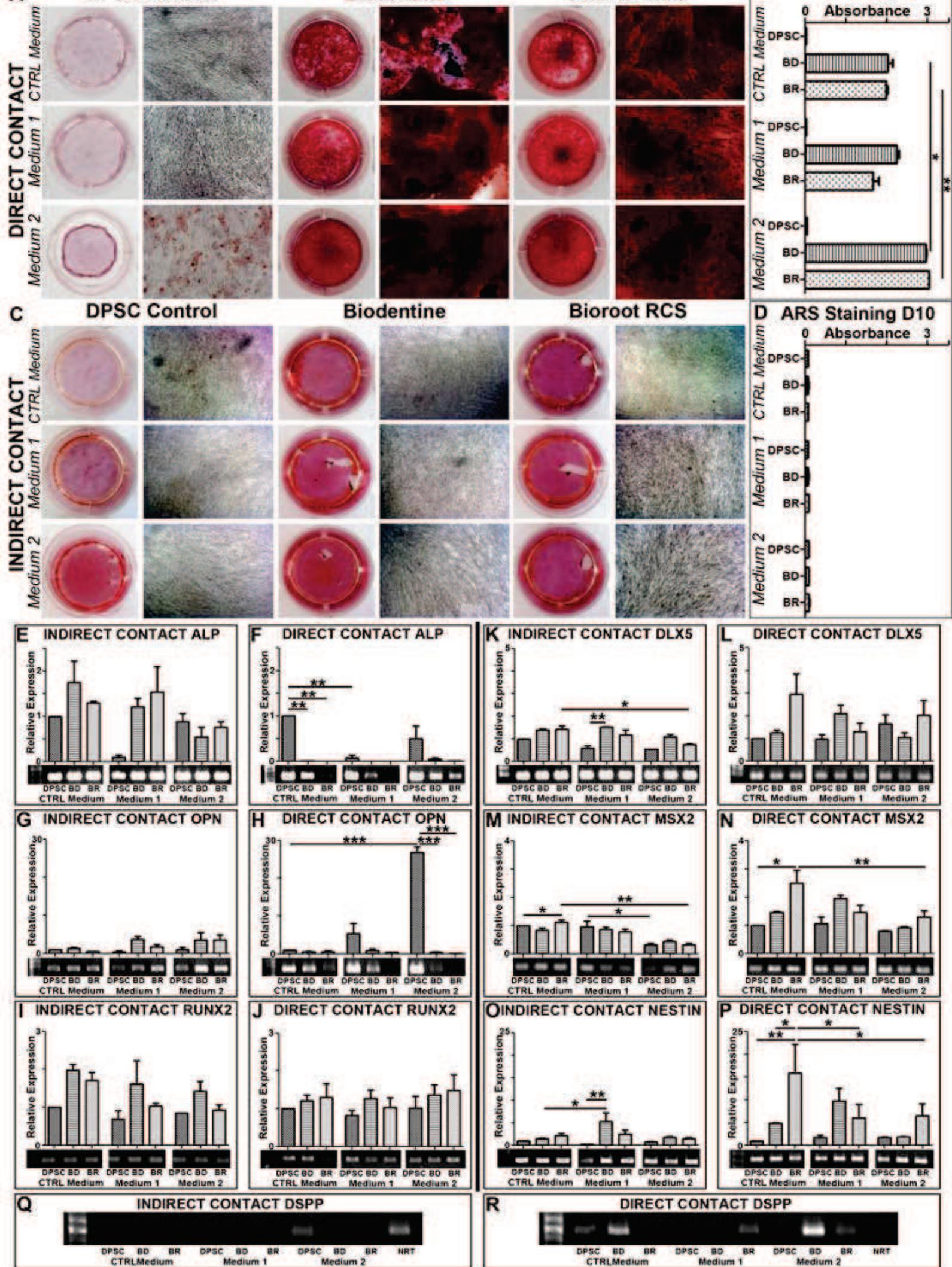


Figure 6 DPSC Control



Supplementary Material

[Click here to download Supplementary Material: Table 2 supp datas.docx](#)

CHAPITRE 4 : DISCUSSION

Ces dernières années, plusieurs études ont permis de mettre en évidence la présence de cellules qualifiées « de souches » au sein des fibroblastes gingivaux ; ces cellules présentent des propriétés similaires aux cellules souches adultes. Elles ont en effet une capacité à former des CFU-F, présentent des marqueurs de cellules souches, et peuvent se différencier dans divers lignages (Fournier et al., 2010; Marynka-Kalmani et al., 2010; Tang, Nan, Han, & Yan, 2011; Qunzhou Zhang et al., 2009; QZ Zhang et al., 2010).

- *Méthode d'isolation des fibroblastes gingivaux*

Dans le but d'utiliser le tissu gingival comme une source de cellules souches mésenchymateuses en médecine régénérative ou en ingénierie tissulaire, un consensus doit être établi en ce qui concerne la méthode d'isolation de ces cellules. Les méthodes d'explant et de digestion sont usuellement utilisées dans les laboratoires pour l'isolation de fibroblastes gingivaux. Bien qu'il y ait de petites différences entre les laboratoires, ces deux méthodes sont pratiques et efficaces (Fournier et al., 2010; Wang et al., 2011). Cependant, selon les auteurs, différents protocoles d'utilisation existent et plusieurs types d'enzymes peuvent être utilisées seules ou en combinaison. Les deux protocoles ont déjà été comparés pour l'isolement de cellules souches mésenchymateuses dans certains tissus humains tels que les tissus adipeux, la gelée de Wharton, le synovium, le cordon ombilical ou encore le ligament parodontal (Borim et al., 2015; Lee et al., 2011). Ces études, comme la nôtre, ont révélé que la méthode par explant entraîne un meilleur succès et permet d'obtenir une population cellulaire plus homogène avec un potentiel de différenciation multipotent. De plus, le recours à des enzymes peut amener un risque supplémentaire de contamination xénogénique de la culture (Carvalho, Gimble, Dias, Gomes, & Reis, 2013). Notre étude est néanmoins la première à comparer l'effet des différents protocoles ou enzymes utilisés sur l'isolation des fibroblastes issus de la gencive et à montrer s'ils sélectionnent tous les mêmes cellules appelées « fibroblastes gingivaux ». Les fibroblastes sont les cellules stromales les plus abondantes du tissu conjonctif proprement dit. Nous avons montré comme d'autres études, que les fibroblastes partagent plusieurs caractéristiques communes avec les cellules souches mésenchymateuses, y compris une morphologie de cellule de type fuseau, une adhérence au plastique et un profil de marqueur de surface cellulaire similaire (Haniffa et al., 2009). Par exemple, les cellules

gingivales humaines possèdent un potentiel de différenciation multipotent *in vitro*, mais cette propriété peut également être retrouvée dans les cultures de fibroblastes gingivaux humains ou encore dermiques humains (Lorenz, Sicker, Schmelzer, Rupf, & Salvetter, 2008; Mostafa et al., 2011).

Néanmoins, nous avons toujours pensé que nous ne sélectionnons pas exactement les mêmes cellules. Notre principale hypothèse est que les premières cellules qui migrent de l'explant vers la boîte sont les plus mobiles. Une qualité intéressante car la mobilité cellulaire semble jouer un rôle important dans de nombreux processus physiologiques et pathologiques de la cavité buccale telles que l'inflammation; ou encore la cicatrisation d'une plaie. Nos résultats suggèrent que les cellules obtenues à partir d'explant présentent une meilleure capacité de migration par rapport à la digestion chimique. Néanmoins, rien ne permet d'affirmer que les cellules sont différentes ; et nous ne pouvons pas exclure un rôle néfaste des enzymes utilisées sur les capacités de migration des cellules issues de digestion.

Perspective i :

Dans les deux méthodes testées, nous avons eu recours au sérum de bœuf fœtal comme additif du milieu d'expansion. L'objectif à venir sera donc de trouver un milieu d'isolation sans sérum pour pouvoir utiliser ces cellules en thérapie cellulaire. De plus, il serait nécessaire de réaliser un travail plus poussé sur les capacités de cicatrisation des cellules issues des deux méthodes. Pour finir, s'il existe des preuves que les cellules souches représentent une sous-population de fibroblastes en raison de leur faible fréquence (Fournier et al., 2013; Lari Häkkinen et al., 2014), une élucidation plus poussée de la relation exacte entre les populations de fibroblastes et de cellules souches gingivales de cellules semble nécessaire.

- *La gencive est un réservoir de CSCN, cellule souche dérivées des crêtes neurales*

Plusieurs études ont suggéré que le tissu gingival dérivait des crêtes neurales (CN) et que le tissu conjonctif gingival était par conséquent composé de cellules semblables à celles des crêtes neurales (Marynka-Kalmani et al., 2010; Xu et al., 2013). Dans cette thèse, nous avons pu montrer la présence *in vivo* de cellules dérivées de crêtes neurales au sein de la gencive de souris transgéniques Wnt1-Cre / R26R-YFP âgées de 8 mois et ainsi démontrer que ces cellules continuent d'exister pendant le vieillissement. C'est la première fois que de tels résultats sont décrits chez des animaux aussi âgés. Nous avons ensuite montré que les cellules du tissu gingival d'adulte humain dérivent bien des crêtes neurales et partagent les propriétés

de ces cellules. Ainsi nous avons premièrement montré que les fibroblastes gingivaux expriment la nestine, une molécule du cytosquelette présente dans les progéniteurs neuraux / cellules souches, ainsi que les facteurs de transcription typiquement liés aux crêtes neurales Snai1, Twist1, Pax3, Sox9 et FoxD3 (Kaltschmidt et al., 2011). Pour ce faire, les cellules ont été cultivées en suspension, dans un milieu sans sérum, dans lequel les cellules se rassemblent pour former des sphères flottantes appelées neurosphères en présence d'additifs. Ce phénomène a été aussi décrit par une autre équipe (Qunzhou Zhang et al., 2016). On a montré que la formation de ces neurosphères composées de cellules gingivales dépendait de la connexin 43 ; une molécule également trouvée dans les jonctions cellulaires des cellules dérivées des CN (Curchoe et al., 2010) ; ainsi que du calcium (certainement par l'intermédiaire des cadhérines). Autre fait intéressant, les cellules présentes au sein de ces neurosphères ont montré une augmentation significative de l'expression des gènes liés aux crêtes neurales : nestine, la ténascine-C ou encore Sox9 ; associée à une diminution du collagène de type I liée au phénotype mésenchymateux, de plus les cellules s'organisent spontanément au sein de ces sphères avec les cellules nestine+ en périphérie sur une structure sous-jacente riche en collagène4, laminine et ténascine C. Pour finir, nous avons montré que les cellules de ces sphères flottantes présentent un potentiel de différenciation neurale ; une autre caractéristique décrite pour les cellules souches dérivées des CN (J G Toma et al., 2001). Au cours de cette thèse d'autres études ont montré de manière plus approfondie la différenciation de cellules souches gingivales en neurones ou encore cellule de Schwann *in vitro* et *in vivo* (Qunzhou Zhang et al., 2016).

Perspective ii :

Le défi suivant serait d'obtenir une méthode d'isolation permettant d'obtenir des neurosphères directement à partir de biopsies de gencive et ainsi éviter l'utilisation de milieu avec sérum. De plus, la suite logique des expériences de différenciation neuronale serait de tester *in vivo* leur capacité à former des cellules neuronales dans des sites hétérotopiques. Il serait intéressant également de voir si ces cellules différenciées permettent de restaurer des défauts neuronaux et selon quels mécanismes, comme récemment montré dans une étude (Qunzhou Zhang et al., 2016).

- *La gencive est une population hétérogène constituée de sous-populations cellules souches*

Ces dernières années, beaucoup d'études ont été réalisées sur l'existence de cellules souches mésenchymateuses dans de nombreux tissus adultes ; sans arriver réellement à les distinguer des fibroblastes constituant ces tissus. Malgré une hétérogénéité fonctionnelle des fibroblastes ; les définitions actuelles soulignent les propriétés génériques des cellules mais ne parviennent pas à distinguer de marqueurs spécifiques permettant leur sélection (Lari Häkkinen et al., 2014). Actuellement, la technologie de tri cellulaire par FACS ou cytométrie de flux selon certains marqueurs de surface est la méthode la plus utilisée afin de sélectionner une sous-population spécifique. Cependant, ces méthodes ne permettent pas une sélection spécifique des sous-populations car elles ne possèdent pas de marqueurs spécifiques comme on peut l'observer dans d'autres sources tissulaires (Haniffa et al., 2009). De plus les marqueurs évoluent dans le temps et sont progressivement perdus pendant la culture (Boxall & Jones, 2012; Ishii et al., 2005). Néanmoins, beaucoup d'équipes sont arrivées à sélectionner des populations de cellules; basées sur l'expression de certains marqueurs comme CD146 (marqueur de péricytes) (Tsang et al., 2013), Stro1 (Gronthos et al., 1994) ou SSEA-4 (un antigène associé aux cellules souches embryonnaire) entre autres (Gang, Bosnakovski, Figueiredo, Visser, & Perlingeiro, 2007). Dans notre étude nous avons pu observer des variations du marqueur CD146 dans les différentes sous-populations sans pour autant le relier à d'autres paramètres tels que la prolifération ou la multipotence. Nous avons pu cependant démontrer que l'expression de SSEA-4 est dynamique et hétérogène au sein des cultures comme (Borim et al., 2015). Bien qu'encore controversée, SSEA-4 semble être un marqueur spécifique de sous-population de MSC de la moelle osseuse ayant un fort taux auto-renouvellement et de différenciation dans divers tissus (Fukushima et al., 2012; Kawanabe et al., 2012). Des études récentes ont montré qu'une population de cellules nichées dans la lamina propria de la gencive humaine présente des marqueurs liés à la pluripotence, Oct-4, SSEA-4 et Stro-1 (Tang et al., 2011), avec certains co-exprimant Oct-4 / SSEA-4 ou Oct4 / Stro-1 (Qunzhou Zhang et al., 2009), une limite évidente de ces études réside dans l'utilisation d'anticorps anti-Oct4 qui ne différencie pas Oct4A, B et B1. Plus encore, il a été montré que la gencive héberge une population de cellules positives pour la neurotrophine p75NTR, un marqueur de cellules souches neurales (Marynka-Kalmani et al., 2010). Dans notre étude, la proportion de cellules Stro1 positives ou p75NTR s'est avérée sans différence et quasiment nulle dans les sous-populations étudiées.

La plus grande partie de ce travail de thèse a eu pour but de mieux comprendre et caractériser *in vitro* le phénotype des sous-populations fibroblastiques. Nous avons pu mettre en évidence que la gencive est une population hétérogène constituée de sous-populations cellulaires ayant une capacité de différenciation différente. La majorité de ces sous-populations présentaient des propriétés communes aux cellules souches adultes. Elles sont capables d'auto-renouvellement, expriment les marqueurs de surface cellulaire liée aux CSM, peuvent se différencier dans les lignées mésenchymateuses et présentent les caractéristiques de cellules souches mésenchymateuses dérivées des crêtes neurales. Nous avons néanmoins pu mettre en évidence une expression d'Oct4A positive dans quelques sous-populations multipotentes. C'est la seule corrélation que nous ayons pu mettre en évidence entre l'expression d'un gène et la multipotence.

Perspective iii :

De nouvelles études *in vitro* sont nécessaires pour confirmer ce travail ; car notre étude comporte certaines limites, comme un faible nombre de clones testés et dans des conditions de culture *in vitro* différentes du microenvironnement *in vivo*. Il serait intéressant de comparer la multipotence des différentes sous-populations multipotentes sur des modèles animaux mais également de comparer la sous population Oct4A+ avec d'autres isolées par d'autres auteurs comme C1qR+ (Bordin, Whitfield, & Alerts, 2003). Et pourquoi pas chercher d'autres méthodes d'isolation ; à l'image de la culture en boîte non adhérente ou sur matériau (exemple le chitosan). Cependant, si ces méthodes permettent d'isoler des cellules sous forme de sphères ; elles ne sont pas en mesure de sélectionner des sous- populations (Hsu, Huang, & Feng, 2012; Qunzhou Zhang et al., 2012).

Il est évident que d'autres études sont à envisager pour améliorer la compréhension des sous-populations de fibroblastes gingivaux et des cellules souches adultes en général. L'étude de la niche gingivale en tant que source de cellules multipotentes, voire pluripotente doit être également poursuivie. Le nombre accru de publications concernant ces cellules montre l'intérêt croissant pour cette dernière en vue d'applications thérapeutiques. Leur multipotence certes, mais également leur facilité de prélèvement, leur rapide propagation *in vitro*, leur stabilité chromosomique et leur fort pouvoir immunosuppresseur en font une cellule d'avenir dans l'arsenal thérapeutique au cours des décennies à venir (Durand et al., 2012; Gogly et al., 2007). Il faut cependant encore améliorer la localisation de cette niche, les méthodes de prélèvements, d'expansion *in vitro* et la fiabilité/efficacité de leur différenciation pour atteindre les objectifs d'une thérapie cellulaire efficiente.

BIBLIOGRAPHIE

- Alliot-Licht, B., Bluteau, G., Magne, D., Lopez-Cazaux, S., Lieubeau, B., Daculsi, G., & Guicheux, J. (2005). Dexamethasone stimulates differentiation of odontoblast-like cells in human dental pulp cultures. *Cell and Tissue Research*, *321*(3), 391–400. <http://doi.org/10.1007/s00441-005-1115-7>
- Aslan, H., Zilberman, Y., Kandel, L., Liebergall, M., Oskouian, R. J., Gazit, D., & Gazit, Z. (2006). Osteogenic differentiation of noncultured immunisolated bone marrow-derived CD105+ cells. *Stem Cells*, *24*(7), 1728–1737. <http://doi.org/10.1634/stemcells.2005-0546>
- Atlasi, Y., Mowla, S., Ziaee, S., Gokhale, P., & Andrews, P. (2008). OCT4 Spliced variants are differentially expressed in human pluripotent and nonpluripotent cells. *Stem Cells*, *26*(12), 3068–3074. <http://doi.org/10.1634/stemcells.2008-0530>
- Bensidhoum, M., Chapel, A., Francois, S., Demarquay, C., Mazurier, C., Fouillard, L., ... Lopez, M. (2004). Homing of in vitro expanded Stro-1- or Stro-1+ human mesenchymal stem cells into the NOD/SCID mouse and their role in supporting human CD34 cell engraftment. *Blood*, *103*(9), 3313–3319. <http://doi.org/10.1182/blood-2003-04-1121>.Supported
- Bianco, P., Robey, P. G., & Simmons, P. J. (2008). Mesenchymal stem cells : revisiting history, concepts, and assays. *Cell Research*, *2*(4), 313–319. <http://doi.org/10.1016/j.stem.2008.03.002>
- Boor, P., & Floege, J. (2012). The renal (myo-)fibroblast: A heterogeneous group of cells. *Nephrology Dialysis Transplantation*, *27*(8), 3027–3036. <http://doi.org/10.1093/ndt/gfs296>
- Bordin, S., Whitfield, D., & Alerts, E. (2003). Cutting Edge: Proliferating Fibroblasts Respond to Collagenous C1q with Phosphorylation of p38 Mitogen-Activated Protein Kinase and Apoptotic Features. *Journal of Immunology*, *170*(2), 667–671. <http://doi.org/10.4049/jimmunol.170.2.667>
- Borim, A., Sunghun, N., Sungeun, L., Woo Jin, K., Se-Ran, Y., Heung-Myong, W., ... Seok-Ho, H. (2015). Non-enzymatic isolation followed by supplementation of basic fibroblast growth factor improves proliferation , clonogenic capacity and SSEA-4 expression of perivascular cells from human umbilical cord. *Cell and Tissue Research*, *359*(3), 767–777. <http://doi.org/10.1007/s00441-014-2066-7>
- Boxall, S., & Jones, E. (2012). Markers for characterization of bone marrow multipotential stromal cells. *Stem Cells International*, *2012*(975871). <http://doi.org/10.1155/2012/975871>
- Campagnoli, C., Roberts, I. A. G., Kumar, S., Bennett, P. R., Bellantuono, I., & Fisk, N. M. (2016). Identification of mesenchymal stem/progenitor cells in human first-trimester fetal blood, liver, and bone marrow. *Blood*, *98*(8), 2396–2402.
- Camps, J., Jeanneau, C., Ayachi, I. El, Laurent, P., & About, I. (2015). Bioactivity of a Calcium Silicate – based Endodontic Cement (BioRoot RCS): Interactions with Human Periodontal Ligament Cells In Vitro. *Journal of Endodontics*, *41*(9), 1469–1473. <http://doi.org/10.1016/j.joen.2015.04.011>
- Caplan, A. I. (1991). Mesenchymal stem cells. *Journal of Orthopaedic Research*, *9*(5), 641–650.
- Carrel, A., & Ebeling, A. (1921). THE MULTIPLICATION OF FIBROBLASTS IN VITRO. *The Journal of Experimental Medicine*, *34*(4), 317–337.
- Carvalho, P., Gimble, J., Dias, I., Gomes, M., & Reis, R. (2013). Xenofree enzymatic products for the isolation of human adipose-derived stromal/stem cells. *Tissue Engineering Part C Methods.*, *19*(6), 473–478. <http://doi.org/10.1089/ten.tec.2012.0465>
- Chai, Y., Jiang, X., Ito, Y., Bringas, P., Han, J., Rowitch, D. H., ... Sucov, H. M. (2000). Fate of the mammalian cranial neural crest during tooth and mandibular morphogenesis. *Development*, *127*, 1671–1679.
- Chang, H. Y., Chi, J., Dudoit, S., Bondre, C., Rijn, M. Van De, Botstein, D., & Brown, P. O. (2002). Diversity, topographic differentiation, and positional memory in human fibroblasts. *PNAS*, *99*(20), 12877–12882.
- Chavrier, C., Couble, M., Magloire, H., & Grimaud, J. (1984). Connective tissue organization of healthy human gingiva. Ultrastructural localization of collagen types I-III-IV. *Journal of Periodontal Research*, *19*(3), 221–229.
- Cho, M., & Garant, P. (2000). Development and general structure of the periodontium. *Periodontology 2000*, *24*, 9–27.
- Choi, K., Seo, Y., Yoon, H., Song, K., Kwon, S., Lee, H., & Park, J. (2008). Effect of ascorbic acid on bone marrow-derived mesenchymal stem cell proliferation and differentiation. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, *105*(6), 586–594. <http://doi.org/10.1263/jbb.105.586>
- Cobourne, M. T., & Mitsiadis, T. (2006). Neural Crest Cells and Patterning of the Mammalian Dentition. *Journal of Experimental Zoology Part B: Molecular and Developmental Evolution*, *306B*(3), 251–260.

- <http://doi.org/10.1002/jez.b>
- Coura, G., Garcez, R., Mendes De Aguiar, C., & Magini, R. (2008). Human periodontal ligament : a niche of neural crest stem cells. *Journal of Periodontal Research*, *43*(5), 531–536. <http://doi.org/10.1111/j.1600-0765.2007.01065.x>
- Cuaranta-Monroy, I., Simandi, Z., Kolostyak, Z., Doan-Xuan, Q., Poliska, S., Horvath, A., ... Nagy, L. (2014). Highly efficient differentiation of embryonic stem cells into adipocytes by ascorbic acid. *Stem Cell Research*, *13*(1), 88–97. <http://doi.org/10.1016/j.scr.2014.04.015>
- Curchoe, C., Maurer, J., Mckeown, S., Cattarossi, G., Cimadamore, F., Nilbratt, M., ... Terskikh, A. (2010). Early acquisition of neural crest competence during hESCs neuralization. *PLoS One*, *5*(11), e13890. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0013890>
- D'aquino, R., Graziano, A., Sampaolesi, M., Laino, G., Pirozzi, G., De Rosa, A., & Papaccio, G. (2007). Human postnatal dental pulp cells co-differentiate into osteoblasts and endotheliocytes : a pivotal synergy leading to adult bone tissue formation. *Cell Death & Differentiation*, *14*(6), 1162–1171. <http://doi.org/10.1038/sj.cdd.4402121>
- Das, S., Bonaguidi, M., Muro, K., & Kessler, J. (2008). Generation of embryonic stem cells: limitations of and alternatives to inner cell mass harvest. *Journal of Neurosurgery*, *24*(3–4), 1–6. <http://doi.org/10.3171/FOC/2008/24/3>
- Dimitrova-nakov, S., Uzunoglu, E., Ardila-osorio, H., Baudry, A., Richard, G., Kellermann, O., & Goldberg, M. (2015). In vitro bioactivity of Bioroot TM RCS , via A4 mouse pulpal stem cells. *Dental Materials*, *31*(11), 1290–1297. <http://doi.org/10.1016/j.dental.2015.08.163>
- Dominici, M., Blanc, K. Le, Mueller, I., Marini, F. C., Krause, D. S., Deans, R. J., ... Horwitz, E. M. (2006). Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells . The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*, *8*(4), 315–317. <http://doi.org/10.1080/14653240600855905>
- Durand, E., Fournier, B., Couty, L., Lemitre, M., Achouh, P., Julia, P., ... Lafont, A. (2012). Endoluminal Gingival Fibroblast Transfer Reduces the Size of Rabbit Carotid Aneurisms via Elastin Repair. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, *32*(8), 1892–1901. <http://doi.org/10.1161/ATVBAHA.112.251439>
- Egusa, H., Sonoyama, W., Nishimura, M., Atsuta, I., & Akiyama, K. (2012). Stem cells in dentistry – Part I : Stem cell sources. *Journal of Prosthodontic Research*, *56*(3), 151–165. <http://doi.org/10.1016/j.jpjor.2012.06.001>
- Erices, A., Conget, P., & Minguell, J. (2000). Mesenchymal progenitor cells in human umbilical cord blood. *British Journal of Haematology*, *109*(1), 235–242.
- Evans, M., & Kaufman, M. (1981). Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature*, *292*(5819), 154–156. <http://doi.org/doi:10.1038/292154a0>
- Ferracane, J. (2011). Resin composite--state of the art. *Dental Materials*, *27*(1), 29–38. <http://doi.org/10.1016/j.dental.2010.10.020>
- Forbes, S., Vig, P., Poulson, R., Thomas, H., & Alison, M. (2002). Hepatic stem cells. *The Journal of Pathology*, *197*(4), 510–518.
- Fournier, B., Ferre, F., Couty, L., Lataillade, J., Gourven, M., Naveau, A., ... Gogly, B. (2010). Multipotent progenitor cells in gingival connective tissue. *Tissue Engineering Part A*, *16*(9), 2891–2899. <http://doi.org/10.1089/ten.tea.2009.0796>
- Fournier, B., Larjava, H., & Häkkinen, L. (2013). Gingiva as a source of stem cells with therapeutic potential. *Stem Cells and Development*, *22*(24), 3157–77. <http://doi.org/10.1089/scd.2013.0015>
- Fron, H., & Smail, V. (2013). Clinical efficacy of composite versus ceramic inlays and onlays : A systematic review. *Dental Materials*, *29*(12), 1209–1218. <http://doi.org/10.1016/j.dental.2013.09.009>
- Fukushima, H., Kawanabe, N., Murata, S., Ishihara, Y., Yanagita, T., Balam, T. A., & Yamashiro, T. (2012). SSEA-4 is a Marker of Human Deciduous Periodontal Ligament Stem Cells. *Journal of Dental Research*, *91*(10), 955–961. <http://doi.org/10.1177/0022034512458123>
- Gang, E. J., Bosnakovski, D., Figueiredo, C. A., Visser, J. W., & Perlingeiro, R. C. R. (2007). SSEA-4 identifies mesenchymal stem cells from bone marrow. *Blood*, *109*(4), 1743–1752. <http://doi.org/10.1182/blood-2005-11-010504>
- Ghoniem, A., Yahya, A., Wiltfang, J., & Gierloff, M. (2015). Improved adipogenic in vitro differentiation : comparison of different adipogenic cell culture media on human fat and bone stroma cells for fat tissue engineering. *Anatomy & Cell Biology*, *48*(2), 85–94.
- Gimble, J., & Guilak, F. (2003). Adipose-derived adult stem cells: isolation, characterization, and differentiation potential. *Cytotherapy*, *5*(5), 362–369. <http://doi.org/10.1080/14653240310003026>
- Gogly, B., Naveau, A., Fournier, B., Reinald, N., Durand, E., Brasselet, C., ... Lafont, A. (2007). Preservation of rabbit aorta elastin from degradation by gingival fibroblasts in an ex vivo model. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, *27*(9), 1984–1990. <http://doi.org/10.1161/ATVBAHA.107.140640>

- Göke, J., Jung, M., Behrens, S., Chavez, L., O'Keeffe, S., Timmermann, B., ... Vingron, M. (2011). Combinatorial Binding in Human and Mouse Embryonic Stem Cells Identifies Conserved Enhancers Active in Early Embryonic Development. *PLoS Computational Biology*, 7(12). <http://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1002304>
- Gronthos, S., Graves, S., Ohta, S., & Simmons, P. (1994). The STRO-1+ Fraction of Adult Human Bone Marrow Contains the Osteogenic Precursors. *Blood*, 84(12), 4164–4173.
- Gronthos, S., Mankani, M., Brahimi, J., Robey, P. G., & Shi, S. (2000). Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(25), 13625–13630. <http://doi.org/10.1073/pnas.240309797>
- Guilak, F., Lott, K., Awad, H., Cao, Q., Hicok, K., Fermor, B., & Gimble, J. (2006). Clonal analysis of the differentiation potential of human adipose-derived adult stem cells. *Journal of Cellular Physiology*, 206(1), 229–237. <http://doi.org/10.1002/jcp.20463>
- Häkkinen, L., & Larjava, H. (1992). Characterization of fibroblast clones from periodontal granulation tissue in vitro. *Journal of Dental Research*, 71(12), 1901–1907.
- Häkkinen, L., Larjava, H., & Fournier, B. P. J. (2014). Distinct phenotype and therapeutic potential of gingival fibroblasts. *Cytotherapy*, 16(9), 1171–1186. <http://doi.org/10.1016/j.jcyt.2014.04.004>
- Häkkinen, L., Larjava, H., & Koivisto, L. (2011). Granulation tissue formation and remodeling. *Endodontics Topics*, 24, 94–129.
- Häkkinen, L., Uitto, V. J., & Larjava, H. (2000). Cell biology of gingival wound healing. *Periodontology 2000*, 24, 127–152. <http://doi.org/10.1034/j.1600-0757.2000.2240107.x>
- Haniffa, M. a., Collin, M. P., Buckley, C. D., & Dazzi, F. (2009). Mesenchymal stem cells: The fibroblasts' new clothes? *Haematologica*, 94(2), 258–263. <http://doi.org/10.3324/haematol.13699>
- Hanks, C. (1979). Insulin and hydrocortisone influences on cultured rat tongue epithelium. *Archives of Oral Biology*, 24(10–11), 765–776.
- Hauner, H., Entenmann, G., Wabitsch, M., Gaillard, D., Ailhaud, G., Negrel, R., & Pfeiffer, E. (1989). Promoting effect of glucocorticoids on the differentiation of human adipocyte precursor cells cultured in a chemically defined medium. *Journal of Clinical Investigation*, 84(5), 1663–1670.
- Hemrich, K., Heimbürg, D. Von, Cierpka, K., Haydarlioglu, S., & Pallua, N. (2005). Optimization of the differentiation of human preadipocytes in vitro. *Differentiation*, 73(1), 28–35. <http://doi.org/10.1111/j.1432-0436.2005.07301003.x>
- Hernigou, P. (2015). Bone transplantation and tissue engineering, part IV. Mesenchymal stem cells : history in orthopedic surgery from Cohnheim and Goujon to the Nobel Prize of Yamanaka. *International Orthopaedics*, 39(4), 807–817. <http://doi.org/10.1007/s00264-015-2716-8>
- Hsu, S., Huang, G., & Feng, F. (2012). Biomaterials Isolation of the multipotent MSC subpopulation from human gingival fibroblasts by culturing on chitosan membranes. *Biomaterials*, 33(9), 2642–2655. <http://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2011.12.032>
- Ibarretxe, G., Crende, O., Aurrekoetxea, M., Garc, V., Etxaniz, J., & Unda, F. (2012). Neural Crest Stem Cells from Dental Tissues : A New Hope for Dental and Neural Regeneration. *Stem Cells International*, 2012. <http://doi.org/10.1155/2012/103503>
- Irwin, C., Picardo, M., Ellis, I., Sloan, P., Grey, A., McGurk, M., & Schor, S. (1994). Inter- and intra-site heterogeneity in the expression of fetal-like phenotypic characteristics by gingival fibroblasts : potential significance for wound healing. *Journal of Cell Science*, 107(Pt5), 1333–1346.
- Ishii, M., Koike, C., Igarashi, A., Yamanaka, K., Pan, H., Higashi, Y., ... Kato, Y. (2005). Molecular markers distinguish bone marrow mesenchymal stem cells from fibroblasts. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 332(1), 297–303. <http://doi.org/10.1016/j.bbrc.2005.04.118>
- Jaenisch, R., & Young, R. (2008). Stem Cells , the Molecular Circuitry of Pluripotency and Nuclear Reprogramming. *Cell*, 132(4), 567–582. <http://doi.org/10.1016/j.cell.2008.01.015>
- Ji, J., Ng, S., Sharma, V., Neculai, D., Hussein, S., Sam, M., ... Batada, N. (2012). Elevated Coding Mutation Rate During the Reprogramming of Human Somatic Cells into Induced Pluripotent Stem Cells. *Stem Cells*, 30(3), 435–440. <http://doi.org/10.1002/stem.1011>
- Johnstone, B., Hering, T., Caplan, A., Goldberg, V., & Yoo, J. (1998). In Vitro Chondrogenesis of Bone Marrow-Derived Mesenchymal Progenitor Cells. *Experimental Cell Research*, 238(1), 265–272.
- Jones, D. L., & Wagers, A. J. (2008). No place like home: anatomy and function of the stem cell niche. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 9(1), 11–21. <http://doi.org/10.1038/nrm2319>
- Kaltschmidt, B., Kaltschmidt, C., & Widera, D. (2011). Adult Craniofacial Stem Cells : Sources and Relation to the Neural Crest. *Stem Cell Reviews and Reports*, 8(3), 658–671. <http://doi.org/10.1007/s12015-011-9340-9>
- Kawanabe, N., Fukushima, H., Ishihara, Y., Yanagita, T., Kurosaka, H., & Yamashiro, T. (2015). Isolation and

- characterization of SSEA-4-positive subpopulation of human deciduous dental pulp cells. *Clinical Oral Investigations*, 19(2), 363–371. <http://doi.org/10.1007/s00784-014-1260-z>
- Kawanabe, N., Murata, S., Fukushima, H., Ishihara, Y., Yanagita, T., Yanagita, E., ... Yamashiro, T. (2012). Stage-specific embryonic antigen-4 identifies human dental pulp stem cells. *Experimental Cell Research*, 318(5), 453–463. <http://doi.org/10.1016/j.yexcr.2012.01.008>
- Keeley, E. C., Mehrad, B., & Strieter, R. M. (2010). Fibrocytes: Bringing new insights into mechanisms of inflammation and fibrosis. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 42(4), 535–542. <http://doi.org/10.1016/j.biocel.2009.10.014>
- Kellinsalmi, M., Parikka, V., Risteli, J., Hentunen, T., Leskelä, H., Lehtonen, S., ... Lehenkari, P. (2007). Inhibition of cyclooxygenase-2 down-regulates osteoclast and osteoblast differentiation and favours adipocyte formation in vitro. *European Journal of Pharmacology*, 572(2–3), 102–110. <http://doi.org/10.1016/j.ejphar.2007.06.030>
- Kieffer, E., Kuntz, S., & Viville, S. (2010). Tour d’horizon des lignées de cellules souches pluripotentes. *Médecine/sciences*, 26(10), 848–854.
- Kim, B., Choi, K., Yim, H., & Lee, M. (2013). Ascorbic acid enhances adipogenesis of 3T3-L1 murine preadipocyte through differential expression of collagens. *Lipids in Health and Disease*, 1–8.
- Kopen, G., Prockop, D., & Phinney, D. (1999). Marrow stromal cells migrate throughout forebrain and cerebellum, and they differentiate into astrocytes after injection into neonatal mouse brains. *PNAS*, 96(19), 10711–10716.
- Kuznetsov, S., Krebsbach, P., Satomura, K., Kerr, J., Riminucci, M., Benayahu, D., & Robey, P. (1997). Single-Colony Derived Strains of Human Marrow Stromal Fibroblasts Form Bone After Transplantation In Vivo. *Journal of Bone and Mineral Research*, 12(9), 1335–1347.
- Laino, G., Aquino, R., Graziano, A., Lanza, V., Carinci, F., Naro, F., ... Papaccio, G. (2005). A New Population of Human Adult Dental Pulp Stem Cells: A Useful Source of Living Autologous Fibrous Bone Tissue (LAB). *Journal of Bone and Mineral Research*, 20(8), 1394–1402. <http://doi.org/10.1359/JBMR.050325>
- Larjava, H., Häkkinen, L., & Rahemtulla, F. (1992). A biochemical analysis of human periodontal tissue proteoglycans. *Biochemical Journal*, 284(Pt1), 267–274.
- Le Blanc, K., & Ringdén, O. (2007). Immunomodulation by mesenchymal stem cells and clinical experience. *Journal of Internal Medicine*, 262(5), 509–525. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2796.2007.01844.x>
- Lee, D., Joo, S., Han, S., Im, J., Lee, S., Sonn, C., & Lee, K. (2011). Isolation and expansion of synovial CD34(-)CD44(+)CD90(+) mesenchymal stem cells: comparison of an enzymatic method and a direct explant technique. *Connective Tissue Research*, 52(3), 226–234. <http://doi.org/10.3109/03008207.2010.516850>
- Lehmann, J., Lenhard, J., Oliver, B., Ringold, G., & Kliewer, S. (1997). Peroxisome proliferator-activated receptors alpha and gamma are activated by indomethacin and other non-steroidal anti-inflammatory drugs. *The Journal of Biological Chemistry*, 272(6), 3406–3410.
- Lemos, D., Paylor, B., Chang, C., Sampaio, A., Underhill, T., & Rossi, F. (2012). Functionally Convergent White Adipogenic Progenitors of Different Lineages Participate in a Diffused System Supporting Tissue Regeneration. *Stem Cells*, 30(6), 1152–1162. <http://doi.org/10.1002/stem.1082>
- Lequeux, C., Auxenfans, C., Mojallal, A., Sergent, M., & Damour, O. (2009). Optimization of a culture medium for the differentiation of preadipocytes into adipocytes in a monolayer. *Bio-Medical Materials and Engineering*, 19(4–5), 283–291. <http://doi.org/10.3233/BME-2009-0593>
- Lewis, R. (n.d.). What are stem cells? Retrieved from <http://www.crm.ed.ac.uk/stem-cells-and-regenerative-medicine/what-are-stem-cells>
- Liedtke, S., Enczmann, J., Waclawczyk, S., Wernet, P., & Kögler, G. (2007). Oct4 and its pseudogenes confuse stem cell research. *Cell Stem Cell*, 1(4), 364–366. <http://doi.org/10.1016/j.stem.2007.09.003>
- Linard, C., Tissedre, F., Busson, E., Holler, V., Leclerc, T., Strup-Perrot, C., ... Coulomb, B. (2015). Therapeutic Potential of Gingival Fibroblasts for Cutaneous Radiation Syndrome: Comparison to Bone Marrow-Mesenchymal Stem Cell Grafts. *Stem Cells and Development*, 24(10), 1182–1193. <http://doi.org/10.1089/scd.2014.0486>
- Liu, K., Wang, K., & Yan, H. (2009). Incomplete digestion preserves chondrocytes from dedifferentiating in long-term culture on plastic substrate. *Tissue and Cell*, 41(1), 1–11. <http://doi.org/10.1016/j.tice.2008.06.002>
- Lorenz, K., Sicker, M., Schmelzer, E., Rupf, T., & Salvetter, J. (2008). Multilineage differentiation potential of human dermal skin-derived fibroblasts. *Experimental Dermatology*, 17(11), 925–932. <http://doi.org/10.1111/j.1600-0625.2008.00724.x>
- Malkondu, Ö., Karapinar Kazandağ, M., & Kazazoğlu, E. (2014). A review on biodentine, a contemporary dentine replacement and repair material. *BioMed Research International*, 2014(160951). <http://doi.org/10.1155/2014/160951>

- Martin, G., & Evans, M. (1975). Differentiation of Clonal Lines of Teratocarcinoma Cells : Formation of Embryoid Bodies In Vitro. *PNAS*, *72*(4), 1441–1445.
- Marynka-Kalmani, K., Treves, S., Yafee, M., Rachima, H., Gafni, Y., Cohen, M., & Pitaru, S. (2010). The Lamina Propria of Adult Human Oral Mucosa Harbors a Novel Stem Cell Population. *Stem Cells*, *28*(5), 984–995. <http://doi.org/10.1002/stem.425>
- Mathupala, S., & Sloan, A. (2009). An agarose-based cloning-ring anchoring method for isolation of viable cell clones. *Biotechniques*, *46*(4), 305–307. <http://doi.org/10.2144/000113079>
- Matsubara, T., Suardita, K., Ishii, M., Sugiyama, M., Igarashi, A., Oda, R., ... Kato, Y. (2005). Alveolar Bone Marrow as a Cell Source for Regenerative Medicine: Differences Between Alveolar and Iliac Bone Marrow Stromal Cells. *Journal of Bone and Mineral Research*, *20*(3), 399–409. <http://doi.org/10.1359/JBMR.041117>
- Menasche, P. (2009). Cell-based Therapy for Heart Disease : A Clinically Oriented Perspective. *Molecular Therapy*, *17*(5), 758–766. <http://doi.org/10.1038/mt.2009.40>
- Miletich, I., & Sharpe, P. (2004). Neural Crest Contribution to Mammalian Tooth Formation. *Birth Defects Research Part C: Embryo Today*, *72*(2), 200–212. <http://doi.org/10.1002/bdrc.20012>
- Miura, M., Gronthos, S., Zhao, M., Lu, B., Fisher, L., Robey, P., & Shi, S. (2003). SHED : Stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *PNAS*, *100*(10), 5807–5812.
- Morszeck, C., Götz, W., Schierholz, J., Zeilhofer, F., Kühn, U., Möhl, C., ... Hoffmann, K. (2005). Isolation of precursor cells (PCs) from human dental follicle of wisdom teeth. *Matrix Biology*, *24*(2), 155–165. <http://doi.org/10.1016/j.matbio.2004.12.004>
- Mostafa, N., Uluda, H., Varkey, M., Dederich, D., Michael, R., & El-Bialy, T. (2011). In Vitro Osteogenic Induction Of Human Gingival Fibroblasts For Bone Regeneration. *The Open Dentistry Journal*, *5*, 139–145.
- Mueller, S., & Glowacki, J. (2001). Age-Related Decline in the Osteogenic Potential of Human Bone Marrow Cells Cultured in Three-Dimensional Collagen Sponges. *Journal of Cellular Biochemistry*, *82*(4), 583–590.
- Muraglia, A., Cancedda, R., & Quarto, R. (2000). Clonal mesenchymal progenitors from human bone marrow differentiate in vitro according to a hierarchical model. *Journal of Cell Science*, *113*(7), 1161–1166.
- Nguyen, J., Ruse, D., Phan, A., & Sadoun, M. (2014). High-temperature-pressure Polymerized Resin-infiltrated. *Journal of Dental Research*, *93*(1), 62–67. <http://doi.org/10.1177/0022034513511972>
- Odorico, J., Kaufman, D., & Thomson, J. (2001). Multilineage Differentiation from Human Embryonic Stem Cell Lines. *Stem Cells*, *19*(3), 193–204.
- Ortega, F., Moreno-Navarrete, J., Ribas, V., Esteve, E., Rodriguez-Hermosa, J., Ruiz, B., ... Fernández-Real, J. (2009). Subcutaneous Fat Shows Higher Thyroid Hormone Receptor-alpha1 Gene Expression Than Omental Fat. *Obesity*, *17*(12), 2134–2141. <http://doi.org/10.1038/oby.2009.110>
- Oswald, J., Boxberger, S., Jørgensen, B., Feldmann, S., Ehninger, G., Bornhäuser, M., & Werner, C. (2004). Mesenchymal Stem Cells Can Be Differentiated Into Endothelial Cells In Vitro. *Stem Cells*, *22*(3), 377–384.
- Pan, G., Chang, Z., Schöler, H., & Pei, D. (2002). Stem cell pluripotency and transcription factor Oct4. *Cell Research*, *12*(5–6), 321–329.
- Phinney, D., & Prockop, D. (2007). Concise Review: Mesenchymal Stem/Multipotent Stromal Cells: The State of Transdifferentiation and Modes of Tissue Repair--Current Views. *Stem Cells*, *25*(11), 2896–2902. <http://doi.org/10.1634/stemcells.2007-0637>
- Phipps, R., Borrello, M., & Blieden, T. (1997). Fibroblast heterogeneity in the periodontium and other tissues. *Journal of Periodontal Research*, *32*(1), 159–165.
- Pittenger, M., Mackay, A., Beck, S., Jaiswal, R., Douglas, R., Mosca, J., ... Marshak, D. (1999). Multilineage Potential of Adult Human Mesenchymal Stem Cells. *Science*, *284*(5411), 143–147. <http://doi.org/10.1126/science.284.5411.143>
- Quarto, R., Thomas, D., & Liang, C. (1995). Bone Progenitor Cell Deficits and the Age-Associated Decline in Bone Repair Capacity. *Calcified Tissue International*, *56*(2), 123–129.
- Reilly, J., Behringer, W., & Trocki, I. (1980). Intraoral keloid: complication of forehead flap. *Otolaryngology and Head and Neck Surgery*, *88*(2), 139–141.
- Rosen, E., & MacDougald, O. (2006). Adipocyte differentiation from the inside out. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *7*(12), 885–897. <http://doi.org/10.1038/nrm2066>
- Russell, K., Lacey, M., Gilliam, J., Phinney, D., & O'Connor, K. (2011). Clonal Analysis of the Proliferation Potential of Human Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells as a Function of Potency. *Biotechnology and Bioengineering*, *108*(11), 2716–2726. <http://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.08.021>. Secreted
- Saely, C., Geiger, K., & Drexel, H. (2012). Brown versus White Adipose Tissue : A Mini-Review. *Gerontology*, *58*(1), 15–23. <http://doi.org/10.1159/000321319>
- Schofield, R. (1978). The relationship between the spleen colony-forming cell and the haemopoietic stem cell. *Blood Cells, Molecules, and Diseases*, *4*((1-2)), 7–25.

- Schor, S., & Schor, A. (1987). Clonal heterogeneity in fibroblast phenotype: implications for the control of epithelial-mesenchymal interactions. *BioEssays*, 7(5), 200–204.
- Schroeder, H., & Listgarten, M. (1997). The gingival tissues: the architecture of periodontal protection. *Periodontology 2000*, 13, 91–120. <http://doi.org/10.1111/j.1600-0757.1997.tb00097.x>
- Scott, M., Nguyen, V., Levi, B., & James, A. (2011). Current Methods of Adipogenic Differentiation of Mesenchymal Stem Cells. *Stem Cells and Development*, 20(10), 1793–1804. <http://doi.org/10.1089/scd.2011.0040>
- Seo, B., Miura, M., Gronthos, S., Bartold, P., Batouli, S., Brahim, J., ... Shi, S. (2004). Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament. *Lancet*, 364(9429), 149–156.
- Shih, D., Lee, D., Chen, S., Tsai, R., Huang, C., Tsai, C., ... Chiu, W. (2005). Isolation and Characterization of Neurogenic Mesenchymal Stem Cells in Human Scalp Tissue. *Stem Cells*, 23(7), 1012–1020. <http://doi.org/10.1634/stemcells.2004-0125>
- Smith, A., & Lesot, H. (2001). Induction and regulation of crown dentinogenesis: embryonic events as a template for dental tissue repair? *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine*, 12(5), 425–437. <http://doi.org/10.1177/10454411010120050501>
- Sonoyama, W., Liu, Y., Fang, D., Yamaza, T., Seo, B., Zhang, C., ... Shi, S. (2006). Mesenchymal Stem Cell-Mediated Functional Tooth Regeneration in Swine. *PLoS One*, 1(e79), 1–8. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0000079>
- Spiegel, A. M. (2013). The stem cell wars: a dispatch from the front. *TRANSACTIONS OF THE AMERICAN CLINICAL AND CLIMATOLOGICAL ASSOCIATION*, 124, 94–110.
- Stevens, A., Zuliani, T., Olejnik, C., LeRoy, H., Obriot, H., Kerr-Conte, J., ... Polakowska, R. (2008). Human Dental Pulp Stem Cells Differentiate into Neural Crest-Derived Melanocytes and Have Label-Retaining and Sphere-Forming Abilities. *Stem Cells and Development*, 17(6), 1175–1184. <http://doi.org/10.1089/scd.2008.0012>
- Sumita, Y., Tsuchiya, S., Asahina, I., Kagami, H., & Honda, M. (2009). The location and characteristics of two populations of dental pulp cells affect tooth development. *European Journal of Oral Sciences*, 117(2), 113–121.
- Szpaderska, A., Zuckerman, J., & Dipietro, L. (2003). Differential injury responses in oral mucosal and cutaneous wounds. *Journal of Dental Research*, 82(8), 621–626.
- Takahashi, K., Tanabe, K., Ohnuki, M., Narita, M., Ichisaka, T., Tomoda, K., & Yamanak, S. (2007). Induction of Pluripotent Stem Cells from Adult Human Fibroblasts by Defined Factors. *Cell*, 131(5), 861–872. <http://doi.org/10.1016/j.cell.2007.11.019>
- Takahashi, K., & Yamanaka, S. (2006). Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors. *Cell*, 126(4), 663–676. <http://doi.org/10.1016/j.cell.2006.07.024>
- Tamori, Y., Masugi, J., Nishino, N., & Kasuga, M. (2002). Role of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- γ in Maintenance of the Characteristics of Mature 3T3-L1 Adipocytes. *Diabetes*, 51(7), 2045–2055.
- Tang, L., Nan, L., Han, X., & Yan, J. (2011). Characterization of Mesenchymal Stem Cells From Human Normal and Hyperplastic Gingiva. *Journal of Cellular Physiology*, 226(3), 832–842. <http://doi.org/10.1002/jcp.22405>
- Taupin, P., & Gage, F. (2002). Adult Neurogenesis and Neural Stem Cells of the Central Nervous System in Mammals. *Journal of Neuroscience Research*, 69(6), 745–749. <http://doi.org/10.1002/jnr.10378>
- Thomson, J., Itskovitz-Eldor, J., Shapiro, S., Waknitz, M., Swiergiel, J., Marshall, V., & Jones, J. (1998). Embryonic Stem Cell Lines Derived from Human Blastocysts. *Science*, 282(5391), 1145–1148.
- Toma, J. G., Akhavan, M., Fernandes, K., Barnabé-Heider, F., Sadikot, A., Kaplan, D., & Miller, F. (2001). Isolation of multipotent adult stem cells from the dermis of mammalian skin. *Nature Cell Biology*, 3(9), 778–784.
- Toma, J. G., McKenzie, I. A., Bagli, D., & Miller, F. (2005). Isolation and characterization of multipotent skin-derived precursors from human skin. *Stem Cells*, 23(6), 727–737. <http://doi.org/10.1634/stemcells.2004-0134>
- Tormin, A., Brune, J., Olsson, E., Valcich, J., Neuman, U., Olofsson, T., ... Scheduling, S. (2009). Characterization of bone marrow-derived mesenchymal stromal cells (MSC) based on gene expression profiling of functionally defined MSC subsets. *Cytotherapy*, 11(2), 114–128. <http://doi.org/10.1080/14653240802716590>
- Tsang, W., Shu, Y., Kwok, P., Zhang, F., Lee, K., Tang, M., ... Wan, C. (2013). CD146+ Human Umbilical Cord Perivascular Cells Maintain Stemness under Hypoxia and as a Cell Source for Skeletal Regeneration. *PLoS One*, 8(10), 1–14. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0076153>
- Vallée, M., Côté, J., & Fradette, J. (2009). Adipose-tissue engineering : Taking advantage of the properties of human adipose-derived stem/stromal cells. *Pathologie Biologie*, 57(4), 309–317. <http://doi.org/10.1016/j.patbio.2008.04.010>
- Van Harmelen, V., Röhrig, K., & Hauner, H. (2004). Comparison of proliferation and differentiation capacity of human adipocyte precursor cells from the omental and subcutaneous adipose tissue depot of obese

- subjects. *Metabolism*, 53(5), 632–637. <http://doi.org/10.1016/j.metabol.2003.11.012>
- Vater, C., Kasten, P., & Stiehler, M. (2011). Culture media for the differentiation of mesenchymal stromal cells. *Acta Biomaterialia*, 7(2), 463–477. <http://doi.org/10.1016/j.actbio.2010.07.037>
- Wang, F., Yu, M., Yan, X., Wen, Y., Zeng, Q., Yue, W., ... Pei, X. (2011). Gingiva-Derived Mesenchymal Stem Cell-Mediated Therapeutic Approach for Bone Tissue Regeneration. *Stem Cells and Development*, 20(12), 2093–2102. <http://doi.org/10.1089/scd.2010.0523>
- Watts, G. (2011). Leonard Hayflick and the limits of ageing. *Lancet*, 377(9783), 2075. [http://doi.org/10.1016/S0140-6736\(11\)60908-2](http://doi.org/10.1016/S0140-6736(11)60908-2)
- Weinberg, D., Tham, V., Hardin, N., Antley, C., Cohen, A., Hunt, K., ... Goldberg, R. (2007). Eyelid mucous membrane grafts: a histologic study of hard palate, nasal turbinate, and buccal mucosal grafts. *Ophthalmic Plastic & Reconstructive Surgery*, 23(3), 211–216.
- Williams, D. (2008). On the mechanisms of biocompatibility. *Biomaterials*, 29(20), 2941–2953. <http://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2008.04.023>
- Williams, S., McKenney, S., & Jarrell, B. (1995). Collagenase lot selection and purification for adipose tissue digestion. *Cell Transplantation*, 4(3), 281–289.
- Winning, T., & Townsend, G. (2000). Oral Mucosal Embryology and Histology. *Clinics in Dermatology*, 18(5), 499–511.
- Xu, X., Chen, C., Akiyama, K., Chai, Y., Le, A., Wang, Z., & Shi, S. (2013). Gingivae contain neural-crest- and mesoderm-derived mesenchymal stem cells. *Journal of Dental Research*, 92(9), 825–832. <http://doi.org/10.1177/0022034513497961>
- Young, R., Butler, D., Weber, W., Gordon, S., & Fink, D. (1998). Use of Mesenchymal Stem Cells in a Collagen Matrix for Achilles Tendon Repair. *Journal of Orthopaedic Research*, 16(4), 406–413.
- Yu, J., Vodyanik, M., Smuga-Otto, K., Antosiewicz-Bourget, J., Frane, J., Tian, S., ... Thomson, J. (2007). Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science*, 318(5858), 1917–1920. <http://doi.org/10.1126/science.1151526>
- Yuan, S., Guo, Y., Zhou, X., Shen, W., & Chen, H. (2014). Rosiglitazone accentuates the adipogenesis of hemangioma-derived mesenchymal stem cells induced by adipogenic media. *International Journal of Clinical and Experimental Medicine*, 7(7), 1741–1746.
- Zhang, Q., Nguyen, A., Shi, S., Hill, C., Wilder-Smith, P., Krasieva, T., & Le, A. (2012). Three-dimensional Spheroid Culture of Human Gingiva-Derived Mesenchymal Stem Cells Enhances Mitigation of Chemotherapy-Induced Oral Mucositis. *Stem Cells and Development*, 21(6), 937–947. <http://doi.org/10.1089/scd.2011.0252>
- Zhang, Q., Nguyen, A., Yu, W., & Le, A. (2012). Human oral mucosa and gingiva: A unique reservoir for mesenchymal stem cells. *Journal of Dental Research*, 91(11), 1011–1018. <http://doi.org/10.1177/0022034512461016>
- Zhang, Q., Nguyen, P., Xu, Q., Park, W., Lee, S., Furuhashi, A., & Le, A. (2016). Neural Progenitor-Like Cells Induced From Human Gingiva-Derived Mesenchymal Stem Cells Regulate Myelination of Schwann Cells in Rat Sciatic Nerve Regeneration. *Stem Cells Translational Medicine*, 1–13.
- Zhang, Q., Shi, S., Liu, Y., Uyanne, J., Shi, Y., Shi, S., & Le, A. (2009). Mesenchymal stem cells derived from human gingiva are capable of immunomodulatory functions and ameliorate inflammation-related tissue destruction in experimental colitis. *The Journal of Immunology*, 183(12), 7787–7798. <http://doi.org/10.4049/jimmunol.0902318>
- Zhang, Q., Su, W., Shi, S., Wilder-Smith, P., Xiang, A., Wong, A., ... Le, A. (2010). Human Gingiva-Derived Mesenchymal Stem Cells Elicit Polarization of M2 Macrophages and Enhance Cutaneous Wound Healing. *Stem Cells*, 28(10), 1856–1868. <http://doi.org/10.1002/stem.503>
- Zuk, P. A., Zhu, M., Mizuno, H., Huang, J., Futrell, J., Katz, A., ... Hedrick, M. (2001). Multilineage cells from human adipose tissue: Implications for cell-based therapies. *Tissue Engineering*, 7(2), 211–229.

La gencive correspond à un modèle de régénération naturelle grâce notamment à sa capacité de cicatrisation « ad integrum ». Ce phénomène est permis par sa composition en fibroblastes gingivaux. Ces cellules, composante cellulaire principale du tissu conjonctif gingival, sont au cœur de la régulation des réponses inflammatoires et de la cicatrisation. Ce tissu contient, comme d'autres tissus mésenchymateux, des cellules souches ; qui expliquent en partie ces capacités de régénération. De plus, comme le tissu gingival est abondant et facilement accessible, l'utilisation de ces cellules souches pourraient être d'un intérêt prometteur en thérapie cellulaire ou pour de la modélisation *in vitro*. Au cours de cette thèse, nous avons pu montrer que les Cellules Souches dérivées de la Gencive Humaine (CSGH) possèdent des propriétés communes avec les cellules souches adultes dérivées des crêtes neurales. Ces cellules peuvent être qualifiées de « souche » par leur capacité d'auto-renouvellement, d'adhésion au plastique et de multipotence. Premièrement, nous avons montré que la méthode ainsi que les produits de culture utilisés pour l'isolation des fibroblastes gingivaux *in vitro* à partir de biopsies de gencive avait une influence sur les cellules obtenues. Dans un second temps, une analyse clonale *in vitro* de populations de fibroblastes gingivaux a permis de montrer que les fibroblastes gingivaux sont composés de sous-populations qui expriment des marqueurs spécifiques des cellules souches et des crêtes neurales. Outre leur origine embryologique, l'étude de leur multipotence a aussi été caractérisée après expansion et en fonction des additifs utilisés. Pour finir, deux exemples d'utilisation de ces cellules ainsi de cellules souches pulpaire comme modèle d'étude de la biocompatibilité de biomatériaux *in vitro* ont été développés ; imitant la muqueuse buccale ainsi que les réactions dentaires (réparatrices et réactionnaire).

Gingiva is a natural regeneration model thanks to its "ad integrum" healing capability. Gingival fibroblasts are the main actors of this property. These cells, the main cellular component of the gingival connective tissue, regulate the inflammatory responses and healing process. This tissue contains, like many others, mesenchymal stem cells; which also partly explain these regenerative abilities. Moreover, as the gingiva is abundant and easily accessible, the use of these stem cells may interest cell therapy or *in vitro* model tissues responses. In this work, we demonstrated that Stem Cells Derived from Human Gingiva (GSCH) have common properties with neural crest adult stem cells. These cells can be called "stem cells" for their ability to self-renew, adhere to plastic and to differentiate. First, we have shown that the method and the culture products used for isolation of gingival fibroblasts from gingival biopsy had an influence on the obtained cells. Secondly, an analysis of *in vitro* clonal populations of gingival fibroblasts has shown that gingival fibroblasts are composed of subpopulations that express specific markers of stem cells and neural crests. In addition to their embryological origin, the study of their multipotency was also characterized after expansion and depending on the used additives. Finally, two examples of using these cells and dental pulp stem cells as a model to study the *in vitro* biocompatibility of biomaterials have been developed, mimicking oral mucosa or dentin reactions (reparative or reactional).

Mots clés français: fibroblaste gingival, cellules souches, crêtes neurales, différenciation, culture cellulaire, clone cellulaire.

Mots clés anglais: gingival fibroblast, stem cells, neural crest, differentiation, cell culture, cell clone.

Laboratoire: Centre de recherché des Cordeliers
INSERM UMR_S1138 – Laboratoire de physiopathologie orale moléculaire
15, rue de l'école de médecine. 75 006 Paris