



**HAL**  
open science

# Bio-ingénierie d'une molaire et son innervation après implantation en site osseux

Marion Strub

► **To cite this version:**

Marion Strub. Bio-ingénierie d'une molaire et son innervation après implantation en site osseux. Chirurgie. Université de Strasbourg, 2020. Français. NNT : 2020STRAJ066 . tel-03543192

**HAL Id: tel-03543192**

**<https://theses.hal.science/tel-03543192v1>**

Submitted on 25 Jan 2022

**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.

École Doctorale des Sciences de la Vie et de la Santé  
UMR 1260 Nanomédecine régénérative

**THÈSE**

**Marion STRUB**

Soutenue publiquement le 25 septembre 2020

Pour obtenir le grade de Docteur de l'Université de Strasbourg

Discipline : Sciences de la vie et de la santé

**Bio-ingénierie d'une molaire et son innervation  
après implantation en site osseux**

Directeur de thèse : **Dr Sabine Kuchler-Bopp**, Chargée de Recherche INSERM

Co-directeur : **Pr François Clauss**, PU-PH Université de Strasbourg

---

Rapporteurs externes

**Pr Corinne Tardieu**, PU-PH Aix-Marseille Université

**Pr Jean-Christophe Maurin**, PU-PH Université de Lyon

Examineur externe

**Pr Olivier Sorel**, PU-PH Université de Rennes

Rapporteur interne

**Dr Frédérique René**, MCU Université de Strasbourg

---

**Madame le Professeur Corinne Tardieu,**

Je vous suis extrêmement reconnaissante d'avoir accepté d'être rapporteur de ce travail de thèse. J'ai eu la chance de pouvoir présenter les premiers résultats de ce travail lors du congrès de la Société Française d'Odontologie Pédiatrique en 2017 à Marseille et vous remercie pour la confiance que vous m'avez alors accordée.

**Monsieur le Professeur Jean-Christophe Maurin,**

Vous sachant impliqué depuis de nombreuses années dans le champ d'étude du complexe dentino-pulpaire, vous me faites l'honneur de juger ce travail et je vous en remercie sincèrement.

**Monsieur le Professeur Olivier Sorel,**

Je vous remercie de l'intérêt porté à notre thématique de recherche, que ce soit lors des auditions du CNU ou par l'interface INSERM-SFODF. J'espère que nos travaux sur l'éruption seront à la hauteur de vos attentes.

**Madame le Docteur Frédérique René,**

Je vous remercie d'avoir accepté de siéger dans ce jury. Vos enseignements en matière d'expérimentation animale et en particulier la formation à la chirurgie du rongeur auront marqué ce parcours de thèse.

**Madame le Docteur Sabine Kuchler-Bopp**

Merci de m'avoir fait découvrir le monde de la recherche, du master à la thèse, et de m'avoir transmis cette passion pour l'expérimentation chez la souris (et ses déboires). Au plaisir de continuer cette collaboration dans les années à venir.

**Monsieur le Professeur François Clauss,**

Merci pour le temps consacré à ces travaux, à la relecture du manuscrit et pour toutes ces suggestions. Ces quelques années passées à vos côtés en clinique, à la faculté et au laboratoire me laissent entrevoir les années à venir sous les meilleurs auspices.

**Madame le Docteur Nadia Benkirane-Jessel,**

Je vous remercie de m'avoir accueillie avec enthousiasme dans l'UMR 1260 dès mon master et de m'avoir permis de travailler sur la régénération de la dent.

**Madame le Professeur Marie-Cécile Manière,**

Je vous dois ce début de carrière hospitalo-universitaire, sans vos précieux conseils je n'en serais pas là aujourd'hui. Mon (mauvais) caractère et mes maladresses n'ont pas eu raison de votre patience et de votre soutien, je vous en suis infiniment reconnaissante. J'espère être digne de cette équipe que vous avez construite, en odontologie pédiatrique comme au CRMR, et qui œuvre chaque jour pour le bien-être de nos patients.

**Madame le Professeur Corinne Taddéi-Gross,** Doyen de la faculté de chirurgie dentaire,

Je vous remercie pour la confiance que vous m'avez accordée en me permettant d'intégrer l'équipe enseignante de la Faculté, comme assistante hospitalo-universitaire puis comme maître de conférences des Universités.

**Madame le Professeur Anne-Marie Musset,** Chef du Pôle de Médecine et Chirurgie Bucco-Dentaires,

C'est en venant tout d'abord comme praticien attaché dans l'UF du CASU que j'ai pris conscience de la richesse d'un exercice clinique hospitalier, je vous remercie de m'y avoir accueillie.

**Aux membres de l'UMR 1260,** actuels et anciens

**A mes « poupons »** parce que chaque jour de travail passé à vos côtés est une fête :

Damien, je ris déjà à l'idée de passer les 30 prochaines années à travailler avec toi !

Elise, merci pour ton aide et ta patience, pour ces moments où les yeux de nos jeunes patients brillent quand ils découvrent leur nouveau sourire,

Sophie « la blondasse », merci de rendre accessible au commun des mortels dont je fais partie ce savoir scientifique, des souris mutantes aux mystères de l'immunité, et de recadrer ceux qui doivent l'être !

Delphine « de la fouraille », merci pour ces moments magiques autour de nos traumatismes de 18h ou de nos patients si « particuliers », quand l'ODF et la pédo travaillent main dans la main,

Sarah, je me réjouis que tu aies rejoint l'équipe de pédo, les petits patients ont de la chance ! Plus sérieusement merci pour ces sessions chirurgicales sous MEOPA, avec ou sans MEOPA, avec ou sans chirurgie,

Prune, dite « Pulpe », on a fait un petit bout de chemin depuis le congrès de la SFOP à Nice !

Céline, « Mulan », merci pour ta bonne humeur et ton aisance à manipuler les souris dès le 1<sup>er</sup> jour au labo,

Léa, « *il n'y a que le scialytique au-dessus de moi* »,

A tous ceux que je n'ai pas cités ici, mais que je n'oublie pas.

**A ma famille**

Remerciements.....	1
Table des matières .....	3
Abréviations .....	5
1. Introduction.....	7
1.1. Formation de la dent et des tissus de soutien chez la souris .....	9
1.1.1. La mise en place des maxillaires au cours de l'embryogenèse.....	9
1.1.2. L'embryogenèse dentaire chez la souris .....	9
1.1.3. La morphogenèse dentaire post-natale.....	10
1.1.4. L'innervation dentaire chez la souris .....	12
1.2. Les stratégies de régénération de l'organe dentaire.....	16
1.2.1. Les stratégies de régénération basées sur l'utilisation de « scaffolds ».....	16
1.2.2. Biomatériaux et ensemencement cellulaire.....	24
1.2.3. Technique de cell homing .....	27
1.2.4. Les réassociations épithélio-mésenchymateuses.....	29
1.2.5. Les stratégies développées pour stimuler l'innervation des germes dentaires.....	30
1.3. Exemples de facteurs de croissance pour la régénération de l'os alvéolaire .....	34
1.4. Comportement cellulaire à la surface des « scaffolds ».....	37
2. Bio-ingénierie dentaire et innervation.....	40
2.1. Le rôle de la sémaphorine 3A dans l'innervation dentaire chez la souris .....	40
2.2. Utilisation des cellules issues de la moelle osseuse pour stimuler l'innervation des réassociations épithélio-mésenchymateuses .....	53
2.3. Régénération et innervation d'une molaire en site osseux maxillaire.....	63
3. Régénération osseuse maxillaire .....	83
3.1. Régénération osseuse maxillaire chez la souris Wild Type (WT) et chez la souris Tabby.....	83
3.2. Les membranes PCL-BMP-2 : effet sur la régénération osseuse à moyen terme 98	
4. Les mécanismes biologiques de l'éruption dentaire.....	101
4.1. Les théories de l'éruption .....	101
4.2. Tissus dentaires et périodontaires impliqués dans les processus d'éruption....	102
4.2.1. Le follicule dentaire (FD) .....	102
4.2.2. Le réticulum stellaire (RS).....	103
4.2.3. L'os alvéolaire.....	104

4.2.4.	Le ligament parodontal.....	105
4.3.	Les molécules impliquées dans les processus d'éruption.....	105
4.3.1.	Les BMPs (Bone Morphogenetic Proteins) .....	105
4.3.2.	La voie Parathyroid Hormone related Peptide (PTHrP)- Parathyroïde Hormone (PTH) – Parathyroïde Hormone Receptor 1 (PTHR1) .....	106
4.3.3.	La voie de signalisation WNT .....	108
4.3.4.	RUNX2.....	108
4.3.5.	La calcitonine (CT).....	108
4.3.6.	La voie RANK – RANKL -OPG (ostéoprotégérine) .....	109
4.3.7.	CSF-1 .....	109
4.3.8.	MCP-1.....	110
4.3.9.	EGF (Epidermal Growth Factor).....	110
4.3.10.	VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor).....	111
4.4.	Etude de la cinétique de l'éruption des molaires chez la souris.....	112
4.5.	Bio-ingénierie dentaire et éruption : approche expérimentale avec utilisation d'une membrane de polycaprolactone en prévention de l'ankylose du germe.....	116
4.6.	Perspectives .....	125
4.6.1.	Utilisation d'une membrane de PCL fonctionnalisée avec la PTH pour stimuler l'éruption du germe implanté en site osseux.....	125
4.6.2.	Les défauts d'éruption dentaire : mise au point d'un modèle murin, étude des mécanismes biologiques impliqués et développement d'une thérapeutique..	128
	Conclusions .....	140
	<i>Liste des figures et tableau.....</i>	<i>157</i>

**BDNF:** Brain-Derived Neurotrophic Factor  
**BMP:** Bone Morphogenetic Protein  
**BMSCs:** Bone Marrow Stems Cells  
**BSP:** Bone Sialo Protein  
**Ca:** Calcium  
**CaN:** Calcineurine  
**CpN:** Cyclophyline  
**CsA:** Ciclosporine A  
**DEX:** Dysplasie Ectodermique liée à l'X  
**DMEM-F12:** Dulbecco's Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture F-12  
**DMP1:** Dentin Matrix Phosphoprotein 1  
**DPE:** Défaut Primaire d'Eruption  
**DPSCs:** Dental Pulp Stem Cells  
**DSPP:** Dentin SialoPhosphoProtein  
**ED:** Embryonic Day  
**FD:** Follicule Dentaire  
**FDA:** Food and Drug Administration  
**FGF:** Fibroblast Growth Factor  
**GAP43:** Growth Associated Protein 43  
**GFP:** Green Fluorescent Protein  
**HA:** Hydroxyapatite  
**hDPSCs:** human Dental Pulp Stem Cells  
**IDO1:** Indoleamine 2,3-Dioxygenase 1  
**Il-2:** interleukine 2  
**IGF:** Insulin-like Growth Factor  
**iPSCs :** induced Pluripotent Stem Cells  
**MEB:** Microscopie Electronique à Balayage  
**Mg:** Magnésium  
**MSCs:** Mesenchymal Stem Cells  
**NEP:** Noeud de l'Émail Primaire  
**NFAT:** facteur nucléaire des lymphocytes T activés  
**NGF:** Nerve Growth Factor  
**NRP-1:** neuropilin-1  
**NT3:** neurotrophine 3  
**PCL:** polycaprolactone  
**PDLSCs:** Periodontal Ligament Stem Cells  
**PGA:** Polyglycolic Acid  
**PLA:** Polylactic Acid  
**PLGA:** poly-lactic-co-glycolic acid  
**PIGF:** Placental Growth Factor  
**PLLA:** poly(L-lactic acid)  
**PN:** Post-Natal  
**PRF:** Platelet-Rich Fibrine  
**PTH:** Hormone Parathyroïdienne  
**rhBMP-2:** recombinant human BMP-2  
**SDF1:** Stromal Derived Factor 1  
**SEMA 3A:** Sémaphorine 3A  
**SHED:** Stem cells from Human Exfoliated Deciduous teeth  
**Ta:** Tabby  
**TG:** Trigeminal Ganglia  
**TGF-β:** Transforming Growth Factor beta

**VEGF:** Vascular Endothelial Growth Factor  
**WT:** Wild Type

## 1. Introduction

L'organe dentaire joue un rôle fonctionnel central dans la mastication, la phonation et la déglutition mais a aussi un rôle social du fait de sa fonction dans l'esthétique du sourire. C'est un organe complexe constitué de tissus minéralisés qui interagissent avec la pulpe dentaire composée principalement d'éléments vasculaires et nerveux [39]. La dent est indissociable de ses tissus de soutien qui forment le parodonte. Les dents peuvent être absentes pour des raisons carieuses, infectieuses, traumatiques, liées aux séquelles de traitements chirurgicaux ou médicamenteux ou encore absentes de façon congénitale, dans un contexte d'anomalies du développement dentaire isolé ou syndromique (agénésies).

A l'heure actuelle, le remplacement d'une ou plusieurs dents absentes s'appuie sur l'utilisation d'artifices prothétiques. Ces substituts doivent répondre à différents critères comme la résistance mécanique aux forces masticatoires, la biocompatibilité avec les tissus de la cavité buccale, l'absence de dégradation au contact prolongé avec la salive, la compatibilité avec des statuts médicaux spécifiques (risque d'endocardite infectieuse, d'ostéonécrose...), la fonctionnalité et le confort pour le patient, le tout avec un coût acceptable. Les matériaux actuellement utilisés dans le cadre de ces réhabilitations prothétiques ont la particularité de ne pas être sensibles aux stimuli externes comme la température, les contraintes mécaniques ou les stimuli nociceptifs comme pourrait l'être une dent saine face aux attaques carieuses.

La régénération tissulaire est un domaine en pleine expansion en odontologie et a pour principal objectif de remplacer les tissus dentaires lésés ou absents. Cette approche innovante peut faire appel à la biologie cellulaire, l'ingénierie tissulaire, l'expérimentation animale, la biologie du développement ou encore à la bio-informatique, ainsi qu'aux méthodes de « bioprinting » tridimensionnel.

Il existe différentes approches basées sur la régénération d'un type tissulaire particulier constituant la dent (émail, dentine, pulpe), du parodonte (cément, os alvéolaire, ligament alvéolo-dentaire) ou encore d'une dent entière. Dans cette perspective, la vascularisation

et l'innervation de la dent sont essentielles pour le maintien de l'homéostasie et la réponse aux stimuli nociceptifs [86].

Les principales difficultés résident dans l'hétérogénéité des tissus concernés (tissus mous, tissus minéralisés), leur organisation spatiale, leur morphologie typique (anatomie coronaire et radiculaire), leurs propriétés mécaniques et leurs interactions avec les tissus environnants (os maxillaire et mandibulaire).

Les travaux de l'UMR 1260 dans le domaine de l'ingénierie tissulaire dentaire sont basés sur l'utilisation de germes dentaires prélevés au stade capuchon chez l'embryon de souris et cultivés sur un milieu spécifique. En effet, la culture de germes intacts ou de réassociations entre un épithélium dentaire compétent et les cellules mésenchymateuses sur un milieu semi-solide permet de régénérer une molaire *in vitro* [65]. Pour ce faire, les germes des premières molaires mandibulaires de souris sont prélevés au 14<sup>ème</sup> de développement embryonnaire (ED14).

Afin de mieux comprendre les mécanismes biologiques impliqués, nous allons dans une première partie de ce travail dresser un état de l'art dans le domaine de la régénération dentaire en commençant par des rappels d'embryogenèse, puis nous nous attarderons sur les stratégies de régénération dentaire avant de décrire les techniques mises au point pour la régénération de l'os alvéolaire. La seconde partie de ce manuscrit est dédiée aux différents travaux expérimentaux réalisés dans le cadre de l'UMR 1260 portant sur la stimulation de l'innervation de la dent obtenue par bio-ingénierie. La troisième partie est consacrée à la régénération de l'os alvéolaire, indissociable de la régénération de la dent puisqu'il constitue le support à son développement. Enfin le dernier chapitre porte sur l'éruption de cette dent, la régénération tissulaire n'ayant de sens que quand l'organe est fonctionnel et donc dans notre cas quand la dent est visible dans la cavité buccale.

## 1.1. Formation de la dent et des tissus de soutien chez la souris

### 1.1.1. La mise en place des maxillaires au cours de l'embryogenèse

Les cellules mésenchymateuses pluripotentes dérivées des crêtes neurales céphaliques migrent le long du 1er arc pharyngien et se différencient notamment en ostéoblastes pour former la plupart des structures osseuses crânio-faciales [98, 134]. La migration et la différenciation cellulaires sont déterminées génétiquement et régulées par différents facteurs au cours du développement [126, 141]. La mandibule est formée par les deux bourgeons mandibulaires. Les masses fronto-nasales, les processus nasi-latéraux et maxillaires primitifs forment le maxillaire. Le maxillaire se forme par ossification membraneuse alors que la partie condylienne de la mandibule suit un processus d'ossification endochondrale [98].

### 1.1.2. L'embryogenèse dentaire chez la souris

Les auteurs s'accordent à dire que l'embryogenèse de la dent chez la souris débute autour du 10<sup>ème</sup> ou 11<sup>ème</sup> jour de la vie intra-utérine : Shh, Fgf8 et Bmp4 sont exprimés en regard des futurs sites de formation des dents, au niveau des placodes ectodermiques initiant l'odontogenèse [162].

Pendant la vie intra-utérine, l'embryogenèse de la molaire de souris comporte les stades suivants [53, 134] (figure 1) :

- 11<sup>ème</sup>-12<sup>ème</sup> jours : lame dentaire : l'épithélium oral s'épaissit
- 12<sup>ème</sup>-13<sup>ème</sup> jours : bourgeon : l'épithélium bourgeonne et les cellules mésenchymateuses sous-jacentes se condensent
- 13<sup>ème</sup>-15<sup>ème</sup> jours : capuchon : le mésenchyme est progressivement entouré par l'épithélium et forme la papille dentaire qui donnera ensuite la pulpe et les odontoblastes. Une partie des cellules mésenchymateuses, les plus externes, vont entourer l'épithélium et former le follicule dentaire (FD). Du follicule naîtront les cémentoblastes et les fibroblastes qui constitueront le ligament parodontal
- 16<sup>ème</sup> -17<sup>ème</sup> jours : cloche précoce
- 17<sup>ème</sup>-19<sup>ème</sup> jours : cloche tardive.

Le Noeud de l'Émail Primaire (NEP) apparaît au 14<sup>ème</sup> jour de développement embryonnaire (capuchon), constituant un centre de signalisation morphogène important, puis les nœuds de l'émail secondaires au sommet des cuspidés (cloche précoce). La cytodifférenciation des odontoblastes et des améloblastes a lieu dès le 18<sup>ème</sup> jour. Les odontoblastes sécrètent une matrice extracellulaire collagénique qui est ensuite minéralisée pour former la dentine [53, 134].

La cinétique du développement dentaire peut varier d'une lignée à l'autre.

Figure 1 : Schéma du développement dentaire (selon Ikeda *et al.*, 2019) [53].

### 1.1.3. La morphogenèse dentaire post-natale

La morphogenèse coronaire s'achève en phase post-natale, entre la naissance et le 2<sup>ème</sup> jour de vie (PN0 à PN2) [80].

L'édification radiculaire débute au 4<sup>ème</sup> jour de vie, avec l'émergence de la gaine épithéliale de Hertwig. Entre PN6 et PN8 la croissance est rapide. A PN8, la dentinogenèse radiculaire est initiée par les odontoblastes. De nombreux auteurs ont décrit la fenestration de la gaine épithéliale de Hertwig à PN8 [80]. Entre PN10 et PN16, les racines s'allongent considérablement et la minéralisation se poursuit.

Le ligament desmodontal se forme rapidement à partir de PN12 et à PN16 la dent fait son éruption dans la cavité buccale, la morphogenèse est alors achevée [80].

La structure des molaires de souris est semblable à celle des molaires humaines, bien que leurs morphologies diffèrent, en particulier au niveau coronaire (figure 2 : molaire humaine ; figure 3 : molaire de souris).

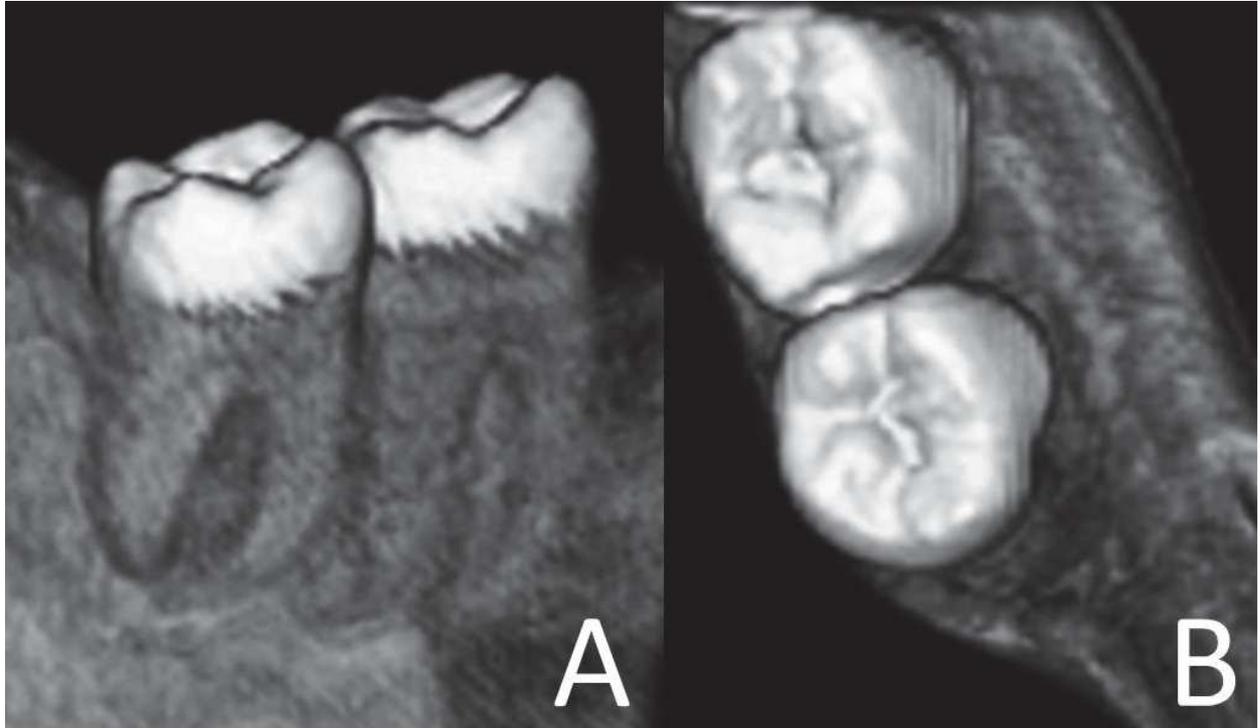


Figure 2: Vue linguale (A) et occlusale (B) de molaires humaines (reconstruction volumique à partir d'acquisitions par CBCT, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, Pôle de MCB, UF de Radiologie).

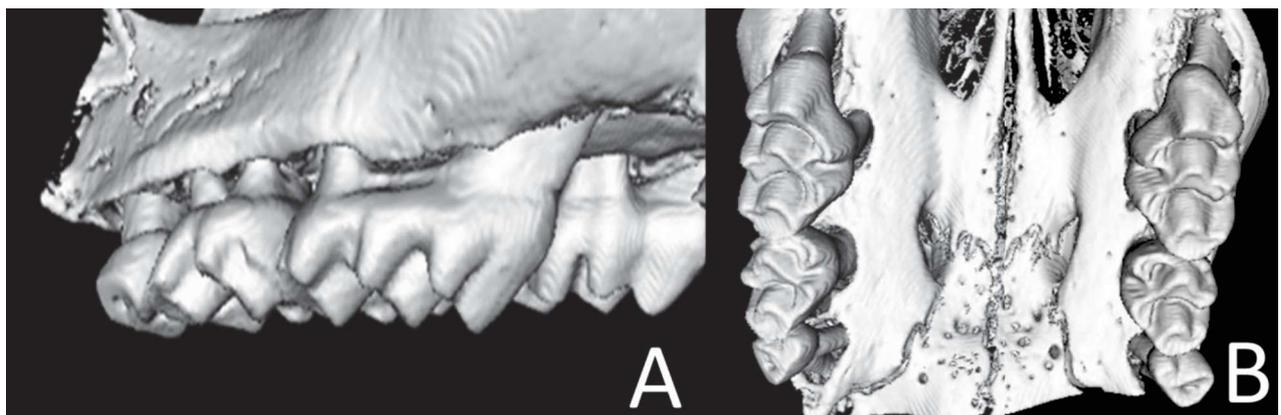


Figure 3 : Vue latérale (A) et occlusale (B) des molaires maxillaires d'une souris « Wild Type » par micro-tomographie à faisceau volumique (reconstruction volumique à partir d'acquisitions réalisées au Biomaterials Science Center, Basel).

La formule dentaire d'une souris est la suivante : trois molaires et une incisive par quadrant. Les incisives sont à croissance continue. La zone dépourvue de dent entre la première molaire et l'incisive est appelée zone diastémale ou diastème. Les souris sont des animaux monophyodonte, c'est-à-dire qu'ils possèdent une seule denture qui n'est pas remplacée, contrairement aux humains qui sont diphyodontes [112].

#### 1.1.4. L'innervation dentaire chez la souris

##### 1.1.4.1. Cinétique de l'innervation

Dès le stade bourgeon, les fibres nerveuses sensibles sont présentes en périphérie du germe et en plus grande quantité en regard de la papille dentaire, où elles s'organisent en plexus au stade de capuchon précoce [79, 91] (figure 4). Elles finissent par pénétrer la papille, plus tardivement au niveau des molaires que des incisives, quand la dentinogenèse est avancée et que les améloblastes sécrètent de l'émail [79]. Elles s'associent ensuite à des vaisseaux sanguins pour former un paquet vasculo-nerveux. Elles n'entrent dans la chambre pulpaire qu'en phase post-natale [79].

Les fibres nerveuses présentes dans le follicule dentaire participeront à l'innervation du futur espace desmodontal [79].

Figure 4 : Localisation des fibres du nerf trijumeau à différents stades de développement au cours de l'histomorphogenèse de la première molaire mandibulaire de la souris (selon Lukko *et al*, 2014) [79].

Abréviations : cm : mésenchyme dentaire condensé ; d : dentine; e : émail; de : épithélium dentaire; dp : pulpe dentaire; oe épithélium oral; p : papille dentaire; pk : nœud de l'émail; pm : mésenchyme dentaire présumé ; fibres nerveuses en noir.

Les fibres nerveuses sont issues du ganglion trigéminal (figure 5) qui est le ganglion nerveux du nerf trijumeau (5<sup>ème</sup> paire de nerfs crâniens) [91]. Ces fibres sensibles permettent de transmettre les signaux nociceptifs et les stimuli mécaniques.

Figure 5 : Localisation du ganglion trigéminal chez la souris  
(schéma adapté de Leijon *et al.*, 2019 [69]).

#### 1.1.4.2. Régulation de l'innervation

L'innervation de la dent au cours du développement est régie par des interactions épithélio-mésenchymateuses et un certain nombre de mécanismes de signalisation moléculaire qui vont moduler à la fois la croissance axonale, la reconnaissance de cibles cellulaires, la migration, la survie et la différenciation des cellules. Leur expression varie dans le temps et dans l'espace [79].

Parmi les molécules neuro-régulatrices exprimées, le Nerve Growth Factor (NGF) et la sémaphorine 3A (SEMA 3A) jouent un rôle clé. Ils vont respectivement attirer et repousser les fibres nerveuses périphériques en regard de la dent en formation. Certaines molécules impliquées dans la morphogenèse jouent également un rôle dans la mise en place de l'innervation, à l'image du TGF $\beta$ 1, de Wnt4 et de FGF3, FGF4 et FGF10 [79].

- Les neurotrophines

Le NGF fait partie de la famille des neurotrophines et est impliqué dans la croissance des fibres nerveuses périphériques, y compris celles du ganglion trigéminal. Il est exprimé au niveau du mésenchyme dentaire, dans le follicule, et surexprimé dans les régions bordant la future cavité pulpaire (figure 6), guidant ainsi la croissance des fibres nerveuses issues du ganglion trigéminal dans lequel il est exprimé dès le 11<sup>ème</sup> jour de vie embryonnaire [76, 79].

Figure 6 : Représentation schématique de la distribution de NGF (en jaune) et de son récepteur (NGF-R) (en vert) dans la première molaire inférieure au cours des étapes successives de l'odontogenèse chez le rat (selon Mitsiadis *et al.*, 1992) [90].

Abréviations : oe: épithélium oral, de: épithélium dentaire, dm: mésenchyme dentaire, bm: membrane basale, df: follicule dentaire, ode: épithélium dentaire externe, ide: épithélium dentaire interne, sr: réticulum stellaire, si: stratum intermedium, dp: papille dentaire, dl: lame dentaire, pa: pré-ameloblastes, PO: odontoblastes polarisés, d: dentine, fo : odontoblastes fonctionnels, O: région occlusale, C: région cervicale. ED: jour embryonnaire.

Le BDNF (Brain-Derived Neurotrophic Factor) est quant à lui essentiel à l'innervation du ligament desmodontal [4].

- La sémaphorine 3A

Sous-famille de la classe des sémaphorines, la sémaphorine 3A est particulièrement impliquée dans la mise en place de l'innervation dentaire. Son expression est régulée finement sur le plan spatio-temporel. On la trouve dans les régions mésenchymateuses dépourvues de fibre nerveuse périphérique, lors des stades avancés de la morphogénèse des molaires [79].

Chez les souris knock-out pour la Sema3A (Sema3A<sup>-/-</sup>), l'innervation dentaire a lieu précocement et de façon ectopique dans le mésenchyme et la papille dentaire. Les fibres nerveuses présentent des défauts de fasciculation. L'expression des autres molécules neurotrophiques est préservée. La SEMA 3A joue ainsi un rôle dans la migration des fibres nerveuses vers les tissus-cibles par un mécanisme de répulsion [61].

Les travaux de Kettunen et coll. (2005) soulignent le lien entre la morphogenèse et l'innervation dentaire [61]. L'expression de la Sema3A dans le mésenchyme est induite par l'épithélium dentaire/oral, avant l'arrivée des fibres nerveuses périphériques. Cette expression est régulée par TGF- $\beta$ 1, FGF et Wnt4 (figure 7) [79].

Figure 7 : Modèle schématique des interactions moléculaires pendant la formation de la dent et du guidage des axones par la Sema3A et d'autres voies de signalisation associées (selon Lukko *et al*, 2014) [79].

## 1.2. Les stratégies de régénération de l'organe dentaire

Nous allons traiter essentiellement les stratégies de régénération dentaire visant à reconstruire une dent dans son intégralité et ne se limitant pas à un seul type tissulaire. Nombreux sont les travaux visant à « revitaliser » une dent en recréant du tissu pulpaire, à développer des biomatériaux guidant une régénération dentinaire ou à régénérer des tissus parodontaux [2, 46, 51, 56]. Cependant notre intérêt s'est focalisé principalement sur l'utilisation de germes dentaires embryonnaires de souris, dissociés ou non, transplantés chez des souris adultes selon différentes conditions expérimentales. Les différents matériaux employés pour la conception de « scaffolds » seront présentés, dans la mesure où leur utilisation, seule ou en association, peut servir de tuteur à la régénération de la dent ou de support pour l'administration de molécules d'intérêt. Dans ce manuscrit nous appellerons « scaffolds », littéralement « échafaudages », les structures dont la forme sert de guide à l'édification d'un tissu ou d'un organe, par exemple une dent, mais aussi les matériaux fonctionnalisés dont l'objectif est de guider la régénération d'un tissu ou d'un organe à proximité en relarguant des facteurs de croissance par exemple, qu'ils soient ostéogéniques, angiogéniques ou neurogéniques.

### 1.2.1. Les stratégies de régénération basées sur l'utilisation de « scaffolds »

Les « scaffolds » servent d'échafaudage à la colonisation cellulaire. Ils miment plus ou moins la matrice extracellulaire, avec leurs propriétés ultra-structurales et leur porosité contrôlée qui doivent permettre l'envahissement cellulaire, la vascularisation et le transport de différents facteurs et nutriments. Le matériau ou l'ensemble des matériaux utilisés doit être biocompatible et permettre l'adhésion et la différenciation cellulaire. Parallèlement à cet envahissement cellulaire, le « scaffold » doit être biodégradable et ses produits de dégradation non toxiques, avec une cinétique de dégradation contrôlée. Il est possible d'associer ces matériaux pour obtenir des matériaux composites aux propriétés physico-chimiques optimisées. La morphologie de l'organe créé est guidée par l'architecture du « scaffold ».

Enfin pour des questions d'hygiène et d'asepsie, le matériau doit être stérilisable avant d'être implanté chez un être vivant. La réaction de l'organisme suite à la mise en place chirurgicale d'un matériau est toutefois inévitable, liée à la fois à la réponse immunitaire

du fait de la rupture de barrières physiques, mais aussi aux processus biologiques de cicatrisation, avec un risque de rejet du corps étranger implanté [58]. L'objectif est de mettre au point un matériau qui interagisse avec l'environnement cellulaire de manière favorable et guide la réponse de l'organisme.

Il existe différentes techniques pour obtenir un « scaffold » notamment l'impression 3D, la stéréolithographie, la méthode du fil fondu ou encore la méthode par frittage laser [164]. Nous nous attarderons uniquement sur la technologie de l'électrospinning puisque c'est une technique largement utilisée au sein de notre unité, l'UMR 1260.

#### 1.2.1.1. Les polymères naturels

- Le collagène

Le collagène peut être utilisé sous forme d'éponges de formes et de structures variables (figure 8), ou sous forme de gel [129, 168]. Ses principaux avantages sont sa capacité à mimer la matrice extracellulaire, ses propriétés faiblement immunogènes et son absence de cytotoxicité [56, 165]. Surtout utilisé dans les travaux de régénération du tissu pulpaire, il permet la migration des cellules souches de la pulpe et leur différenciation en odontoblastes [56].

Figure 8 : Image en microscopie électronique à balayage (MEB) d'une éponge de collagène et son réseau de pores interconnectés (A), avec des pores uniformes de l'ordre de 200 à 500  $\mu\text{m}$ , permettant l'angiogenèse et l'intégration tissulaire pour l'ingénierie tissulaire *in vivo* (B). Éponges de collagène recouvertes d'un fin revêtement de surface minéralisé après application de peptides amphiphiles et deux jours de culture *in vitro* dans un milieu ostéogénique (C) (selon Murphy *et al.*, 2011) [94].

- La fibrine

La fibrine est utilisée essentiellement pour la revascularisation des dents nécrosées, notamment sous forme de PRF (Platelet-Rich Fibrine) [95]. Elle sert de support pour l'angiogenèse et le recrutement des cellules souches mésenchymateuses (MSCs) [19], et permettrait d'induire la différenciation des cellules pulpaire en odontoblastes [56]. En 2019, Han et coll. ont modélisé et imprimé en 3 dimensions une dent constituée d'une structure de polycaprolactone (PCL) remplie à l'aide de deux bio-encre distinctes, une pour la région dentinaire et une pour la région pulpaire (figure 9) [44]. Cette bio-encre était composée de fibrinogène, de gélatine, d'acide hyaluronique, de glycérol et de cellules souches pulpaire humaines (human Dental Pulp Stem Cell : hDPSCs). La différenciation odontoblastique augmente avec la concentration de fibrinogène.

Figure 9 : Processus de bio-impression de complexes pulpo-dentaires en 3D. (a) bio-imprimante 3D et (b) processus d'impression pour produire des complexes pulpo-dentaires 3D patient-spécifiques. Le complexe a été construit par impression de PCL et de deux bio-encre pour la dentine et le tissu pulpaire, couche par couche (selon Han *et al.*, 2019) [44].

- Le chitosan

La chitine est un biopolymère, constituant principal des carapaces de crustacés [165]. Le chitosan est produit à partir d'extraits de chitine désacétylée. Il correspond à un degré de désacétylation de plus de 50% par voie chimique ou enzymatique [165]. Le chitosan est soluble en milieu acide, biocompatible et biodégradable. Il permet l'adhésion, la prolifération et la différenciation cellulaire. Le plus souvent il est associé à l'utilisation de collagène ce qui permet d'avoir un matériau composite avec de meilleures propriétés biologiques et mécaniques [56]. Associé à un hydrogel de fibrine pour la régénération pulpaire, il présente aussi des propriétés antibactériennes [27], Il est également utilisé sous différentes formes (matrice obtenue par électrospinning, par séparation de phase ou par auto-assemblage, microsphères (figure 10) pour la régénération osseuse [133].

Figure 10 : Images en MEB de microsphères de chitosan (CMs) avec de l'adrénomédulline (ADM) (a) et « scaffold » de PLGA/nHA (nano-hydroxyapatite) (b) préparées en présence de CMs-ADM. Les flèches blanches montrent les microsphères de chitosan et les noires celles de nHA sur le scaffold (selon Wang *et al.*, 2013) [145].

- La soie

La protéine de soie est biocompatible, biodégradable [146] et non-immunogène [165]. Son utilisation est approuvée par la « Food and Drug Administration » (FDA), notamment comme fil de suture du fait de ses propriétés mécaniques. Elle est principalement utilisée pour la régénération du tissu osseux [166] et peut être associée à d'autres substances d'intérêt comme l'hydroxyapatite (figure 11).

Figure 11 : Structure tridimensionnelle en MEB des pores formés par les fibres de soie (A) et des « scaffolds » composites fibres de soie – gélatine (B), fibres de soie – hydroxyapatite (C) et fibres de soie – gélatine – hydroxyapatite (D). L'introduction de gélatine et d'hydroxyapatite dans la structure de l'échafaudage ne modifie pas la taille des pores et la structure générale du scaffold (selon Moisenovich *et al.*, 2014) [92].

- L'alginate

L'alginate est un polysaccharide naturel biocompatible et faiblement immunogène, principalement utilisé dans l'industrie agroalimentaire et pharmaceutique. Filardo et coll. (2018) ont montré son intérêt dans le cadre de la régénération ostéocondrale [33]. C'est son association avec des particules d'hydroxyapatite qui lui confère les propriétés nécessaires à la régénération de tissus minéralisés comme la dentine [107]. En effet Panseri et coll. (2016) ont mis au point un « scaffold » à base de gélatine, d'hydroxyapatite (HA), d'ions  $Mg^{2+}$  et d'alginate qu'ils ont lyophilisé avant de le traiter avec une solution aqueuse contenant des ions  $Ca^{2+}$  et de le lyophiliser à nouveau. Le produit final présente une structure poreuse semblable aux canalicules ou tubuli dentinaires (figure 12).

Figure 12 : Analyse en MEB. (A) Coupe longitudinale et (B) coupe transversale du « scaffold » hybride lyophilisé MgHA-Gel/Alginate. (C) : détail des microparticules de gélatine minéralisées (MgHA-Gel) fusionnées dans la matrice d'alginate. (D) Coupe longitudinale et (E, F) coupes transversales du « scaffold » lyophilisé Gel/Alginate comme matériau de référence (selon Panseri *et al.*, 2016) [107].  
Barres d'échelle: (A, D) 500  $\mu\text{m}$ ; (B, E) 200  $\mu\text{m}$ ; (C, F) 50  $\mu\text{m}$ .

L'alginate peut également être utilisé pour encapsuler des cellules. Ainsi, Kanafi et coll. (2014) ont montré que l'association entre un hydrogel d'alginate et des cellules souches de la pulpe dentaire améliorerait leur potentiel ostéogénique [59].

- L'acide hyaluronique

L'acide hyaluronique est un polysaccharide biocompatible et biodégradable. Ses propriétés visco-élastiques, sa dégradation rapide et ses faibles propriétés mécaniques en font un « scaffold » de choix pour la régénération pulpaire mais pas pour les tissus minéralisés [1,5,56]. Il est le plus souvent utilisé sous forme d'éponge, en association avec des facteurs de croissance pour favoriser la cicatrisation des tissus minéralisés et non minéralisés [13,54]. Il a l'avantage d'être bactériostatique [110]. Il est soluble dans l'eau et les molécules relarguées lors des processus de biodégradation contribuent à moduler l'inflammation en inhibant la migration des leucocytes et l'adhésion des neutrophiles [34].

- L'hydroxyapatite

L'hydroxyapatite est une céramique phosphocalcique biocompatible, aux propriétés ostéoconductives et ostéoinductives [116].

Elle mime la structure des tissus minéralisés comme l'os ou la dent. Elle est donc principalement utilisée dans les techniques de régénération dentinaire, du complexe pulpo-dentinaire ou de l'os [116,146], avec ou sans ensemencement préalable de cellules souches.

#### 1.2.1.2. Les polymères synthétiques

- L'acide polylactique (polylactic acid: PLA)

L'acide polylactique est un polyesther biodégradable. Il doit être modifié chimiquement pour optimiser l'adhésion cellulaire et est le plus souvent utilisé sous forme de matériau composite [56]. Des travaux ont montré que la prolifération cellulaire, notamment des cellules pulpaires est supérieure sur des « scaffolds » à base de PLA en comparaison à des « scaffolds » de collagène ou des biocéramiques [15]. Les « scaffolds » de PLA avec une structure nanofibreuse permettent l'angiogenèse notamment lorsqu'ils sont utilisés comme guide pour la régénération osseuse [153]. Il peut induire la différenciation odontoblastique des cellules souches pulpaires (DPSCs) d'où son utilisation dans la régénération du complexe pulpo-dentinaire (figure 13) [144].

Figure 13 : Vue en MEB du « scaffold » NF/PLLA (nanofibrous (NF) poly(L-lactic acid)) à faible grossissement (selon Wang *et al.*, 2010) [144]. Barre=600µm.

- L'acide polyglycolique (polyglycolic acid : PGA)

L'acide polyglycolique est un polymère synthétique biocompatible. Il est utilisé dans les travaux sur la régénération de la pulpe dentaire [37] mais aussi de la couronne [161], en association avec différents types cellulaires.

- La polycaprolactone (PCL)

Polymère biocompatible et biodégradable, la PCL est approuvée par la FDA. Elle peut être utilisée sous forme de matrice nanofibreuse obtenue par électrospinning ou impression 3D [44,68]. Ces matrices ont principalement été développées pour régénérer le tissu pulpaire, la dent entière ou l'os [44,77]. Ainsi Louvrier et coll. (2018) ont mis au point des cônes fibreux de polycaprolactone semblables aux cônes de gutta utilisés lors des traitements endodontiques qu'ils ontensemencés de DPSCs et placés dans un milieu de différenciation odontoblastique. Les cellules ont proliféré à la surface mais aussi à l'intérieur de la matrice fibreuse, tout en se différenciant en ostéocytes, en chondrocytes et en adipocytes [77].

- Les bio-verres

Les bio-verres sont particulièrement intéressants en matière de régénération des tissus minéralisés puisque ce sont des matériaux résorbables avec des propriétés ostéoconductives et ostéoinductives [30]. Ce sont des polymères inorganiques composés le plus souvent d'oxyde de silice, de phosphate et de calcium. Plusieurs études ont mis en évidence leurs capacité à induire une différenciation des cellules souches en cellules dentaires [30]. Ils peuvent être associés à d'autres polymères comme la PCL afin d'améliorer leurs caractéristiques mécaniques ou à certains ions métalliques stimulant l'angiogenèse [30,60].

### 1.2.2. Biomatériaux et ensemencement cellulaire

Comme décrit précédemment, il est possible d'ensemencer ces matériaux avant d'envisager la transplantation *in vivo*. Différents types cellulaires peuvent être utilisés, seuls ou en association. Les plus fréquemment employés dans la régénération de la dent sont décrits ci-dessous. Des molécules bioactives comme des facteurs de croissance peuvent y être associées afin de guider la prolifération et la différenciation de ces cellules, ou leur organisation spatiale et temporelle [93].

- Les cellules du germe dentaire embryonnaire

Les cellules épithéliales et mésenchymateuses constituent le germe dentaire en développement. Elles dérivent des crêtes neurales (figure 14) et de l'ectoderme oral ou pharyngé [14]. Alors que les cellules épithéliales vont essentiellement se différencier en améloblastes, les cellules mésenchymateuses contribueront notamment à former les autres tissus dentaires (pulpe, dentine), les tissus de soutien de la dent (os alvéolaire, ligament parodontal) [162].

Figure 14 : Aperçu des sous-populations cellulaires des crêtes neurales le long de l'axe antéro-postérieur (selon Rothstein *et al.*, 2018) [120].

Xu et coll. (2008) ontensemencé des cellules issues du germe dentaire en développement au stage bourgeon sur différents « scaffolds » de soie [55]. La formation de tissu minéralisé a été évaluée sur des « scaffolds » présentant deux degrés de porosité distincts, à savoir 250 et 550 µm. La soie était ou non associée au peptide RGD (arginine-glycine-acid aspartique). Le matériau donnant les meilleurs résultats était l'association soie-peptide RGD avec une microporosité de l'ordre de 550 µm.

Une équipe de la Tufts University de Boston a développé un « scaffold » associant des cellules de bourgeons dentaires et des cellules souches issues de la moelle osseuse à partir d'un prélèvement iliaque chez le cochon nain (minipig). Ces implants ont été placés en site maxillaire après création d'une cavité osseuse. Un suivi jusqu'à 20 semaines post-opératoire a mis en évidence la formation de structures pseudo-dentaires mais aussi d'os [167].

- Les DPSCs (Dental Pulp Stem Cells)

Ce sont les premières cellules souches d'origine dentaire à avoir été isolées et décrites dès 2000 [43]. Chez l'Homme, les cellules souches de la pulpe dentaire sont relativement faciles d'accès en comparaison avec d'autres types de cellules souches, au point d'être employées pour essayer de régénérer des tissus non-dentaires comme la peau, l'os, les nerfs ou encore les vaisseaux sanguins [24]. Elles peuvent être extraites des dents permanentes comme des dents temporaires, dans ce dernier cas de figure elles sont appelées SHED pour « Stem cells from Human Exfoliated Deciduous teeth » [85].

Ces cellules multipotentes expriment des marqueurs cellulaires similaires aux cellules souches issues de la moelle osseuse (BMSCs) et ont un taux de prolifération supérieur [117]. Elles peuvent produire de façon sporadique des nodules calcifiés [93]. Dans un milieu ostéogénique, elles expriment la sialoprotéine osseuse ou BSP, l'ostéopontine ou OSP et la Dentin Matrix Phosphoprotein 1 ou DMP1. Elles seraient donc capables de se différencier en ostéoblastes et en odontoblastes. Dans des conditions spécifiques, elles peuvent également se différencier en adipocytes, en chondrocytes ou en cellules nerveuses [55, 93,103].

Cain et coll. (2017) ont utilisé des cellules mésenchymateuses post-natales dérivées de la pulpe qu'ils ontensemencées sur un « scaffold » de PCL/PLGA [12] dans lequel ils avaient ou non incorporé de l'hydroxyapatite. L'hydroxyapatite améliore la différenciation cellulaire, mais diminue la porosité. Ces résultats confortent les observations expérimentales précédentes de Kim et coll. (2014) qui ont montré qu'un « scaffold » de PCL, obtenu par électrospinning, additionné d'apatite etensemencé avec des cellules pulpaires donne de meilleurs résultats qu'un « scaffold » de PCL en termes de prolifération et d'expression des marqueurs odontoblastiques (phosphatase alcaline, ostéocalcine, ostéopontine, sialophosphoprotéine dentinaire ou DSPP) [63].

- Les cellules souches du ligament parodontal (PDLSCs)

Les cellules souches du ligament parodontal sont des cellules souches mésenchymateuses qui ont un potentiel ostéogénique [93]. Elles peuvent se différencier en cementoblast-like, en adipocytes ou en cellules produisant du collagène [93]. Surtout utilisées pour tenter de régénérer le parodonte [83,105], leur prélèvement est délicat puisqu'il peut nécessiter l'avulsion d'une dent. Elles sont facilement accessibles d'un point de vue technique, dans la mesure où elles font partie des cellules constituant le ligament parodontal qui fait le lien entre la surface radiculaire et l'os alvéolaire [72]. Cependant elles sont disponibles en petite quantité [105].

- Les cellules souches mésenchymateuses issues de la moelle osseuse

Cette population cellulaire multipotente présente l'avantage d'être disponible en grande quantité [142]. Dans notre domaine, elles peuvent être utilisées pour stimuler la régénération des tissus osseux et parodontaux [105,155]. Nous verrons plus loin qu'elles peuvent également avoir un intérêt du fait de leurs propriétés immunomodulatrices [32].

- Les cellules souches pluripotentes induites (iPSCs)

Leurs propriétés « souches » sont induites artificiellement à partir des cellules différenciées de l'hôte. Elles ont ainsi la capacité de s'auto-renouveler et sont pluripotentes [103]. Dès 2006, Takahashi et coll. ont décrit la dédifférenciation de

fibroblastes en iPSCs grâce à l'expression ectopique de quatre gènes, à savoir Sox2, Oct4, Klf4 et c-Myc [132]. La technique a été ensuite mise au point avec succès pour différents tissus et chez plusieurs espèces dont la souris et l'Homme [103]. Otsu et coll. (2014) ont associé des iPSCs avec des cellules mésenchymateuses dentaires embryonnaires (ED=14,5) sur une éponge collagénique [103]. Après quatre semaines d'implantation *in vivo* dans la capsule rénale de souris immunodéficientes, des structures pseudo-dentaires ont été observées dans quelques cas (<10%), au sein de tératomes. Ils ont également induit la différenciation de ces iPSCs en cellules types de la crête neurale, et les ont associées avec un épithélium dentaire embryonnaire (ED=14,5) sur un gel de collagène ou du milieu semi-solide à base d'agar. Après implantation dans la capsule rénale de souris, des structures dentaires ont pu être observées, indiquant que les cellules de type crête neurale obtenues à partir d'iPSCs ont la capacité de se différencier en odontoblastes *via* leurs interactions réciproques avec l'épithélium dentaire compétent.

### 1.2.3. Technique de cell homing

Les stratégies d'implantation de « scaffolds » cellularisés décrites précédemment sont les plus fréquentes en régénération dentaire. Rares sont les travaux de régénération d'une dent dans son intégralité en ayant recours au cell homing. En effet Kim et coll. (2010) ont mis au point par impression 3D un « scaffold » de PCL et d'hydroxyapatite ayant la forme d'une dent (figure 15) et délivrant de la BMP-7 (Bone Morphogenetic Protein-7) et du SDF1 (Stromal Derived Factor 1) [64]. Ce « scaffold » a été implanté chez le rat sur le site extractionnel d'une incisive. Après 9 semaines, du tissu fibreux ressemblant au ligament parodontal est visible à l'interface entre la dent et l'alvéole et de l'os néoformé a été mis en évidence. Le « scaffold » a été colonisé par des cellules et une angiogenèse s'est mise en place dans les trabéculations. Les techniques de cell homing sont plus souvent réservées à la régénération parodontale ou pulpaire [74,121].

Figure 15 : Conception et fabrication de « scaffolds » dentaires humains et de rat par impression 3D. L'incisive centrale mandibulaire de rat (A) et la première molaire mandibulaire humaine (B) ont été imprimées en 3D en poly-ε-caprolactone et hydroxyapatite, avec des fibres de 200 μm et des micropores (diam. 200 μm), qui servent pour le « cell homing » et l'angiogenèse (C, D). Un mélange de SDF1 (stromal derived factor 1) (100 ng/ml) et de BMP-7 (100 ng/ml) a été intégré dans une solution de collagène de type I neutralisé à 2 mg/ml et injecté dans les micropores du « scaffold » d'incisives de rat (E) et de molaire humaine (F), suivi d'une gélification (selon Kim et al., 2010) [64].

#### 1.2.4. Les réassociations épithélio-mésenchymateuses

Les germes des premières molaires mandibulaires sont prélevés par dissection sous binoculaire et immédiatement mis en culture sur un milieu semi-solide spécifique [67]. Il n'y a alors ni vaisseaux sanguins ni axones. En effet, les fibres nerveuses périphériques s'approchent du bourgeon dentaire au 13<sup>ème</sup> jour de développement embryonnaire mais ne pénètrent la papille dentaire qu'au stade de la cloche tardive.

L'épithélium et le mésenchyme sont dissociés par digestion enzymatique (dispase 1,2 U/mL, trypsine 0.25%, DMEM-F12) pendant 15 min à température ambiante. Puis l'épithélium intact est mis en contact avec les cellules mésenchymateuses sur le milieu semi-solide pendant 5 à 7 jours. Leur implantation sous-cutanée chez la souris adulte aboutit à la formation d'une molaire vascularisée mais non-innervée [67,96]. Il en est de même pour l'implantation de germes intacts (non dissociés).

Cette technique se base sur l'utilisation de cellules dentaires embryonnaires et nécessite donc le sacrifice d'un germe. Cependant comme l'a montré Tsuji et son équipe [159], plusieurs molaires peuvent être produites à partir d'un seul germe par ligature de ce germe au cours du développement, le scindant ainsi en deux. Pour cela, ils prélèvent les germes de souris au stade « capuchon » (ED 14,5), au cours duquel le nœud de l'émail apparaît au niveau épithélial. La ligature est réalisée longitudinalement à l'aide d'un fil de nylon. Cela permet de produire plus de dents mais les couronnes sont moins larges. Dans le cas où la ligature est réalisée plus tôt ou plus tard au cours du développement, les deux couronnes ne se séparent pas entièrement lors de la culture *in vitro*.

Cette approche basée sur l'utilisation de germes présente une contrainte : le temps de latence pendant lequel le germe poursuit son développement dans l'os. Il est possible de s'affranchir de ce délai en implantant une dent dont l'édification est déjà avancée, avec son support parodontal, et donc de contrôler la mise en occlusion [102]. Pour cela une étape transitoire est nécessaire avec l'implantation du germe obtenu par bio-ingénierie dans la capsule rénale pour une durée totale de 60 jours. La molaire est ensuite récupérée avant implantation dans l'os mandibulaire, elle a alors déjà un support osseux périradiculaire (figure 16). Un autre avantage est de restaurer le volume osseux perdu à la suite de l'avulsion.

Figure 16 : Régénération osseuse alvéolaire suite à la transplantation d'une unité dentaire obtenue par bio-ingénierie. (A) Représentation schématique d'un modèle de défaut osseux murin et transplantation d'une unité dentaire obtenue par bio-ingénierie (flèche). (B) Images micro-CT de la régénération osseuse verticale chez les témoins sans transplantation (en haut) et après la transplantation d'une unité dentaire bio-conçue (flèche, en bas) dans un modèle murin de défauts osseux (selon Oshima *et al.*,2011) [102].

### 1.2.5. Les stratégies développées pour stimuler l'innervation des germes dentaires

#### 1.2.5.1. Les traitements systémiques *via* l'eau de boisson

- La ciclosporine A (CsA)

Une des stratégies développées dans notre unité a été le recours à la ciclosporine A, dans un premier temps administrée par voie systémique *via* l'eau de boisson des animaux, qui a permis de stimuler la croissance neuronale et ainsi l'innervation de la dent après deux semaines d'implantation en sous-cutané [65]. La morphologie et la structure de la dent ainsi obtenue sont correctes. La ciclosporine A possède des propriétés immuno-

modulatrices et stimule la croissance axonale par trois voies principales (figure 17) [65,119] :

- en se liant à la cyclophiline (CpN), elle a une action inhibitrice sur la calcineurine (CaN) ce qui a pour effet d'inhiber la translocation du facteur nucléaire des lymphocytes T activés (NFAT), la transcription de l'interleukine 2 (Il-2) et l'inactivation des cellules T;
- en augmentant l'expression de TGF $\beta$ 1 qui va inhiber la prolifération des cellules T;
- en stimulant la production de GAP43 (Growth Associated Protein 43), composant essentiel des axones et synapses.

Figure 17 : Mécanismes d'action de la ciclosporine A (CsA)  
(selon Kokten *et al*, 2014) [65].

## 1.2.5.2. Les membranes nanofibreuses fonctionnalisées

### 1.2.5.2.1. Electrospinning

L'électrospinning est une technique de fabrication de « scaffolds » nanofibreux à partir d'un polymère en solution. Il permet d'obtenir une matrice nanofibreuse dont la structure est propice à la prolifération et aux interactions cellulaires. L'objectif est de mimer la matrice extracellulaire [8]. La taille des fibres (de 1,2 à 1000 nm) et l'architecture de la membrane sont contrôlées, ce qui permet de modifier ses propriétés mécaniques et de se

rapprocher de la structure de différents tissus dont les fibres présentent un niveau d'organisation élevé (tendons, muscles, os) [8,81]. Elle peut servir de « scaffold » ou de support pour l'administration locale de molécules d'intérêt.

Le principe est le suivant : le polymère en solution est injecté dans un champ électrique *via* l'aiguille d'une seringue dont le diamètre est prédéfini. Le solvant s'évapore. Un collecteur permet de recueillir les fibres de polymères ainsi formées (figure 18).

Figure 18 : Principe de l'électrospinning (selon Ghosal *et al.*, 2018) [40].

La porosité (jusqu'à 98,5%) et la structure sont influencées par différents paramètres dont la viscosité de la solution, le voltage utilisé, la distance entre l'aiguille et le collecteur, la vitesse d'injection, la conductivité de la solution et le diamètre de l'aiguille. Les polymères les plus utilisés sont le PLLA (poly-L-lactide acid), le PLGA (poly-lactic-co-glycolic acid), la PCL (polycaprolactone) et le PDLLA (poly-DL-lactic-acid) [8].

Le choix du polymère va dépendre de sa biocompatibilité, ses propriétés mécaniques, sa vitesse de dégradation, ses produits de dégradation, des interactions avec les cellules et de la possibilité de fonctionnalisation. En effet, des molécules d'intérêt ayant par exemple pour rôle de stimuler la prolifération ou la différenciation cellulaire peuvent être ajoutées au polymère. Ces molécules peuvent être présentes dans la masse ou liées chimiquement à la surface par des liaisons covalentes, et relarguées de façon passive ou active. La

technique de fonctionnalisation à l'origine de la création de nanoréservoirs qui a été brevetée dans notre laboratoire, est la plus utilisée dans notre unité et sera décrite plus bas (1.2.5.2.2.).

#### 1.2.5.2.2. Fonctionnalisation par la technologie des nanoréservoirs

La fonctionnalisation des « scaffolds » doit permettre une délivrance locale et une diminution de la toxicité liée à l'administration systémique. Idéalement le relargage de ces substances doit être contrôlé. La technologie des nanoréservoirs permet d'encapsuler l'agent thérapeutique à la surface des fibres (figure 19), ce qui le protège et le stabilise, et c'est au contact des cellules que le contenu de ces réservoirs est libéré. Cette libération active de l'agent se fait par dégradation enzymatique. Au fur et à mesure que les cellules vont pénétrer dans la membrane, elles vont avoir accès à d'autres nanoréservoirs ce qui permet une délivrance progressive de la substance encapsulée [87]. Le principe de préparation repose sur une alternance de bains de polyanions, de solution tampons et de polycations.

Figure 19 : Observation d'implants nanofibreux biomimétiques en MEB. Implant en poly( $\epsilon$ -caprolactone) avec un réseau de nanofibres électrospinnées imitant la matrice du tissu conjonctif (A). Implant en poly( $\epsilon$ -caprolactone) fonctionnalisé avec des nanoréservoirs de facteurs de croissance à la surface des nanofibres (B) (selon Van Bellinghen *et al.*, 2018) [138]. Barre = 3 $\mu$ m.

Des membranes nanostructurées de polycaprolactone fonctionnalisées avec différentes molécules ont été implantées sous la peau avec le germe de la molaire pour stimuler son innervation.

- Le NGF (Nerve Growth Factor)

En 2014, Eap et coll. ont couplé ces réassociations avec une membrane de polycaprolactone fonctionnalisée avec du NGF, ce qui n'a pas permis de stimuler l'innervation du germe dentaire. Cependant l'ajout d'un ganglion trigéminal constituant un apport exogène de fibres nerveuses périphériques a permis cette fois d'innover le germe après deux semaines d'implantation *in vivo* en sous-cutané [28]. La polycaprolactone est un polymère biocompatible qui dans ce cas est utilisée comme support à l'administration locale de NGF.

- La ciclosporine A

Cette molécule peut être à l'origine d'effets secondaires majeurs comme des dysfonctions rénales ou des cancers [89]. Une délivrance locale et à faible dose serait donc préférable, afin d'éviter ces effets systémiques. Pour ce faire, des membranes de PCL ont été fonctionnalisées par la technique des nanoréservoirs afin d'y fixer des molécules de ciclosporine A biodisponibles. La ciclosporine a été encapsulée dans du PLGA. Ces membranes ont été implantées sous la peau avec les réassociations, obtenues entre un épithélium intact (ED=14) et des cellules mésenchymateuses (ED=14) et cultivées pendant 7 jours sur un milieu semi-solide, et un ganglion trigéminal. Des axones ont été détectés au niveau de la pulpe après deux semaines d'implantation. Il a été montré que la membrane n'entravait pas le développement du germe [68].

### 1.3. Exemples de facteurs de croissance pour la régénération de l'os alvéolaire

La régénération de l'organe dentaire ne peut prendre forme que si le support osseux sous-jacent est favorable à son intégration et/ou à son développement. Les « scaffolds » nanofibreux avec leurs pores interconnectés créent un environnement favorable à l'envahissement cellulaire, la différenciation ostéoblastique et la biominéralisation en mimant les propriétés des fibres naturelles de collagène [154]. Dans cette partie nous nous intéresserons principalement aux facteurs de croissance qui pourraient potentialiser l'efficacité des stratégies de régénération dentaire précédemment citées,

dans la mesure où ces protéines pourraient être implémentées dans les différents « scaffolds » existants, optimisant ainsi leurs propriétés intrinsèques.

- Le VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor)

La famille des VEGF comporte 6 membres: VEGF-A (ou VEGF) à VEGF-E et PlGF (facteur de croissance placentaire) [50]. Le VEGF est un facteur angiogénique qui promeut la vascularisation mais aussi la différenciation ostéoblastique et la régénération osseuse [50,93].

Son expression est modulée par un certain nombre de facteurs de croissance, de facteurs de transcription et d'hormones qui jouent un rôle dans le développement et l'homéostasie osseuse :

- Osterix ou Sp7: facteur de transcription exprimé par les cellules de la lignée ostéoblastique, il régule leur différenciation;
- PTH (Hormone Parathyroïdienne);
- TGF- $\beta$  (Transforming Growth Factor beta);
- BMP-2,4,7 (Bone Morphogenetic Proteins);
- IGF (Insulin-like Growth Factor);
- FGF2 (Fibroblast Growth Factor 2) [50].

Des facteurs de l'inflammation comme des interleukines (IL-1, IL-6, IL-8) et des prostaglandines (E1, E2) qui augmentent pendant les processus de cicatrisation osseuse induisent l'expression de VEGF [50]. Les contraintes mécaniques constituent également un élément modulateur de l'expression de VEGF : les ostéoblastes expriment du VEGF qui va stimuler la réponse biologique au niveau osseux [50].

VEGF stimule l'angiogenèse en agissant directement sur les cellules endothéliales mais aussi indirectement en recrutant des macrophages qui vont eux même exprimer des facteurs angiogéniques [50].

La vascularisation est essentielle pour la cicatrisation et la régénération osseuse. La présence d'un réseau vasculaire est donc nécessaire pour créer un micro-environnement favorable à la différenciation et à la prolifération ostéoblastique [35]. Ainsi des scaffolds fonctionnalisés avec des facteurs stimulant la vascularisation ont été développés par

différentes équipes dans le but de stimuler la régénération osseuse, mettant en évidence des résultats prometteurs en termes de volume et de densité osseuse obtenus [35,57,124].

- La BMP-2

Les BMPs (Bone Morphogenetic Proteins) constituent une famille de protéines ostéoinductrices, sous-classe de la superfamille des TGF- $\beta$  à l'exception de la BMP-1. La BMP-2 et la BMP-7 sont utilisées comme molécules thérapeutiques dans la régénération osseuse. La rhBMP-2 (recombinant human BMP-2) est commercialisée sur une éponge collagénique et utilisée avec des structures en titane pour supporter les contraintes mécaniques [29].

Des effets indésirables sont liés à l'utilisation de BMP en excès, d'où l'intérêt de développer des systèmes de libération progressive et contrôlée. En 2014, Ferrand et coll. ont démontré le potentiel ostéogénique des membranes nanofibreuses de PCL fonctionnalisées avec de la BMP-2 et du chitosan pour former les nanoréservoirs [31]. Ces travaux ont été menés *in vitro* et *in vivo* avec implantation en calvaria.

#### 1.4. Comportement cellulaire à la surface des « scaffolds »

Les caractéristiques chimiques et structurelles de l'environnement vont influencer le comportement cellulaire [8]. Les « scaffolds » doivent mimer au mieux, sur le plan ultrastructural, la matrice extracellulaire naturelle et ses fibres (collagène, élastine, kératine...). La nanotopographie du substrat est importante car elle modifie la surface de contact avec les cellules et la disponibilité des protéines présentes à la surface [3,26,130].

- La morphologie cellulaire

La morphologie cellulaire peut être influencée par le substrat sur lequel repose les cellules et notamment par le diamètre des fibres en ce qui concerne les supports nanofibreux. On l'évalue notamment par la capacité des cellules à s'étaler sur la surface. Il est important de contrôler ce paramètre puisqu'il va influencer la disposition des cellules et leurs fonctions [8].

- La disposition spatiale

L'intérêt de contrôler la disposition et l'orientation cellulaires est directement lié au type tissulaire que l'on cherche à régénérer. En effet, certains tissus sont hautement organisés comme les muscles, les tendons, les ligaments ou encore les vaisseaux sanguins dans lesquels les cellules sont alignées de façon spécifique. L'électrospinning permet de créer un « scaffold » dont l'orientation des fibres est contrôlée, les cellules ayant ensuite tendance à suivre cet alignement des nanofibres [8].

- L'attachement cellulaire

L'adhésion cellulaire est meilleure sur les surfaces nanofibreuses que sur les surfaces lisses, ce qui peut s'expliquer par le fait que les cellules et leurs prolongements pénètrent dans la matrice et par l'augmentation des contacts focaux. Là encore le diamètre des fibres est un paramètre à prendre en compte ; le diamètre optimal dépend du type cellulaire et des conditions [8].

- La viabilité et la prolifération cellulaire

La plupart du temps, la survie et la prolifération maximales sont recherchées. Là encore les caractéristiques comme le diamètre des fibres et l'architecture du support sont des facteurs à prendre en compte et dont les effets sont dépendants du type cellulaire [8].

- La différenciation cellulaire

L'architecture de la membrane et le diamètre des fibres peut affecter la différenciation cellulaire, en fonction du type cellulaire et des conditions. Par exemple des cellules souches embryonnaires de souris cultivées sur des nanofibres ont tendance à exprimer des marqueurs de la différenciation ostéoblastique [36,127]. Certains « scaffolds » ont également montré leur capacité à empêcher la différenciation et constituer une niche de cellules souches pluripotentes [8].

L'objectif de nos travaux a été de stimuler l'innervation des germes dentaires implantés chez la souris en développant de nouvelles stratégies, mais également d'obtenir une dent fonctionnelle c'est à dire ayant fait son éruption dans la cavité buccale. Les processus biologiques impliqués dans l'éruption dentaire sont liés aux interactions entre les différents types tissulaires et en particulier entre l'os et la dent. Il est donc essentiel que ces germes obtenus par bioingénierie soient implantés dans un site osseux maxillaire propice à leur développement et à la cicatrisation osseuse, c'est à dire avec un maximum de parois conservées. Ainsi, l'exposé de nos travaux s'articulera autour de trois grands axes à savoir la régénération de l'organe dentaire et son innervation, la régénération osseuse maxillaire et l'éruption dentaire.

---

Chapitre I

Bio-ingénierie dentaire et innervation

---

## 2. Bio-ingénierie dentaire et innervation

### 2.1. Le rôle de la sémaphorine 3A dans l'innervation dentaire chez la souris

#### Objectif expérimental et hypothèses de travail

Le rôle de la sémaphorine 3A (SEMA3A) dans le métabolisme osseux a été décrit [47]. Elle est notamment impliquée dans les processus d'éruption dentaire, lors de la formation du chemin d'éruption intraosseux. L'objectif de nos travaux est alors d'étudier son rôle dans la mise en place de l'innervation des molaires obtenues par bio-ingénierie et implantées chez la souris, la SEMA3A étant un inhibiteur de la croissance axonale.

#### Matériels et méthodes

Des germes de premières molaires mandibulaires ont été prélevés au 14<sup>ème</sup> jour de développement embryonnaire chez des embryons « knock-out » *Sema3A<sup>-/-</sup>*, *Sema3A<sup>+/-</sup>* et *Sema3A<sup>+/+</sup>*, puis cultivés sur un milieu semi-solide pendant 5 jours et implantés sous la peau de souris ICR adultes pendant 2 semaines, en présence d'un ganglion trigéminal. La colonisation de la cavité pulpaire par les fibres nerveuses a été mise en évidence par immunofluorescence à l'aide des anticorps anti-périphérine et anti-NF200. La vascularisation a également été étudiée par immunofluorescence avec un anticorps anti-CD31.

#### Résultats

Les germes issus des embryons *Sema3A<sup>-/-</sup>* et implantés chez les souris ICR sont innervés, mais pas ceux issus des embryons *Sema3A<sup>+/+</sup>*. En revanche, tous les germes sont vascularisés. L'injection, au niveau du site d'implantation des germes et du ganglion trigéminal, du peptide NRP-1 (neuropilin-1), décrit comme un inhibiteur de la sémaphorine 3A, permet d'obtenir une innervation des dents *Sema3A<sup>+/+</sup>* obtenues par bio-ingénierie implantées chez les souris ICR.

#### Discussion

Un des principaux avantages liés à l'utilisation du peptide NRP-1 est la possibilité de l'administrer localement à de très faibles concentrations et donc de s'affranchir des effets indésirables systémiques liés par exemple à l'ingestion de ciclosporine A décrite précédemment, tout en obtenant des résultats similaires en termes d'innervation

dentaire. Le NRP-1 semble offrir de nouvelles perspectives en matière de régénération du tissu nerveux intra-pulpaire, ce qui nécessitera toutefois un développement préclinique et clinique avant une potentielle utilisation chez l'humain.

**En résumé**

L'implantation de germes dentaires en sous-cutané en association avec un ganglion trigéminal chez des souris knock-out pour la sémaphorine 3A permet l'innervation des dents, ce qui n'est pas le cas chez les souris *Sema3A<sup>+/+</sup>*, soulignant ainsi le rôle inhibiteur de la sémaphorine 3A dans l'innervation de la pulpe dentaire. D'autre part, la seule inhibition de la sémaphorine 3A par le NRP-1 permet l'innervation des dents obtenues par bio-ingénierie.

Kuchler-Bopp S, Bagnard D, Van-Der-Heyden M, Idoux-Gillet Y, Strub M, Gegout H, Lesot H, Benkirane-Jessel N, Keller L. Semaphorin 3A receptor inhibitor as a novel therapeutic to promote innervation of bioengineered teeth. *J Tissue Eng Regen Med.* 2018 Apr;12(4):e2151-e2161. doi: 10.1002/term.2648. Epub 2018 Mar 25. PMID: 29430872

Kuchler-Bopp S, Bagnard D, Van-Der-Heyden M, Idoux-Gillet Y, Strub M, Gegout H, Lesot H, Benkirane-Jessel N, Keller L. Semaphorin 3A receptor inhibitor as a novel therapeutic to promote innervation of bioengineered teeth. *J Tissue Eng Regen Med.* 2018 Apr;12(4):e2151-e2161. doi: 10.1002/term.2648. Epub 2018 Mar 25. PMID: 29430872

Kuchler-Bopp S, Bagnard D, Van-Der-Heyden M, Idoux-Gillet Y, Strub M, Gegout H, Lesot H, Benkirane-Jessel N, Keller L. Semaphorin 3A receptor inhibitor as a novel therapeutic to promote innervation of bioengineered teeth. *J Tissue Eng Regen Med.* 2018 Apr;12(4):e2151-e2161. doi: 10.1002/term.2648. Epub 2018 Mar 25. PMID: 29430872

Kuchler-Bopp S, Bagnard D, Van-Der-Heyden M, Idoux-Gillet Y, Strub M, Gegout H, Lesot H, Benkirane-Jessel N, Keller L. Semaphorin 3A receptor inhibitor as a novel therapeutic to promote innervation of bioengineered teeth. *J Tissue Eng Regen Med.* 2018 Apr;12(4):e2151-e2161. doi: 10.1002/term.2648. Epub 2018 Mar 25. PMID: 29430872

Kuchler-Bopp S, Bagnard D, Van-Der-Heyden M, Idoux-Gillet Y, Strub M, Gegout H, Lesot H, Benkirane-Jessel N, Keller L. Semaphorin 3A receptor inhibitor as a novel therapeutic to promote innervation of bioengineered teeth. *J Tissue Eng Regen Med.* 2018 Apr;12(4):e2151-e2161. doi: 10.1002/term.2648. Epub 2018 Mar 25. PMID: 29430872

Kuchler-Bopp S, Bagnard D, Van-Der-Heyden M, Idoux-Gillet Y, Strub M, Gegout H, Lesot H, Benkirane-Jessel N, Keller L. Semaphorin 3A receptor inhibitor as a novel therapeutic to promote innervation of bioengineered teeth. *J Tissue Eng Regen Med.* 2018 Apr;12(4):e2151-e2161. doi: 10.1002/term.2648. Epub 2018 Mar 25. PMID: 29430872

Kuchler-Bopp S, Bagnard D, Van-Der-Heyden M, Idoux-Gillet Y, Strub M, Gegout H, Lesot H, Benkirane-Jessel N, Keller L. Semaphorin 3A receptor inhibitor as a novel therapeutic to promote innervation of bioengineered teeth. *J Tissue Eng Regen Med.* 2018 Apr;12(4):e2151-e2161. doi: 10.1002/term.2648. Epub 2018 Mar 25. PMID: 29430872

Kuchler-Bopp S, Bagnard D, Van-Der-Heyden M, Idoux-Gillet Y, Strub M, Gegout H, Lesot H, Benkirane-Jessel N, Keller L. Semaphorin 3A receptor inhibitor as a novel therapeutic to promote innervation of bioengineered teeth. *J Tissue Eng Regen Med.* 2018 Apr;12(4):e2151-e2161. doi: 10.1002/term.2648. Epub 2018 Mar 25. PMID: 29430872

Kuchler-Bopp S, Bagnard D, Van-Der-Heyden M, Idoux-Gillet Y, Strub M, Gegout H, Lesot H, Benkirane-Jessel N, Keller L. Semaphorin 3A receptor inhibitor as a novel therapeutic to promote innervation of bioengineered teeth. *J Tissue Eng Regen Med.* 2018 Apr;12(4):e2151-e2161. doi: 10.1002/term.2648. Epub 2018 Mar 25. PMID: 29430872

Kuchler-Bopp S, Bagnard D, Van-Der-Heyden M, Idoux-Gillet Y, Strub M, Gegout H, Lesot H, Benkirane-Jessel N, Keller L. Semaphorin 3A receptor inhibitor as a novel therapeutic to promote innervation of bioengineered teeth. *J Tissue Eng Regen Med.* 2018 Apr;12(4):e2151-e2161. doi: 10.1002/term.2648. Epub 2018 Mar 25. PMID: 29430872

Kuchler-Bopp S, Bagnard D, Van-Der-Heyden M, Idoux-Gillet Y, Strub M, Gegout H, Lesot H, Benkirane-Jessel N, Keller L. Semaphorin 3A receptor inhibitor as a novel therapeutic to promote innervation of bioengineered teeth. *J Tissue Eng Regen Med.* 2018 Apr;12(4):e2151-e2161. doi: 10.1002/term.2648. Epub 2018 Mar 25. PMID: 29430872

## 2.2. Utilisation des cellules issues de la moelle osseuse pour stimuler l'innervation des réassociations épithélio-mésenchymateuses

### Objectif expérimental et hypothèse de travail

Dans le cadre de la régénération dentaire *via* les réassociations épithélio-mésenchymateuses, l'objectif de ces travaux a été de remplacer une partie des cellules mésenchymateuses issues du germe dentaire prélevé chez l'embryon par des cellules souches issues de la moelle osseuse afin de stimuler l'innervation de la dent.

### Matériels et méthodes

Nous avons remplacé une quantité prédéfinie (50%) des cellules mésenchymateuses dentaires par des cellules issues de la moelle osseuse dans les réassociations (figure 20). Ces cellules issues de la moelle osseuse ont été prélevées chez des souris GFP afin de suivre leur devenir.

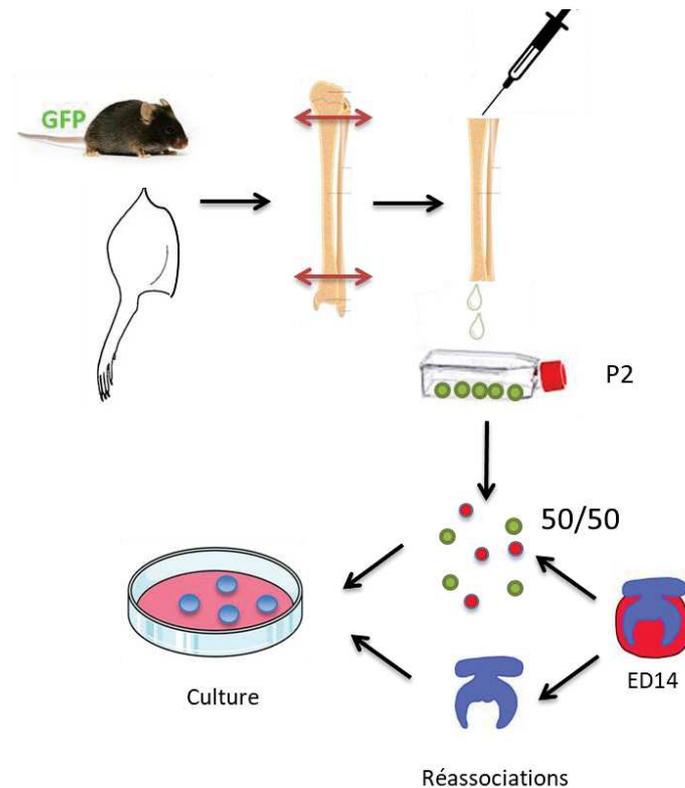


Figure 20 : Protocole schématique des réassociations épithélio-mésenchymateuses associées aux cellules issues de la moelle osseuse.

## Résultats

Les cellules issues de la moelle osseuse sont essentiellement des cellules souches mésenchymateuses. Leurs propriétés immuno-modulatrices et l'expression de facteurs neurotrophiques (NGF, BDNF et NT3) permettent d'aboutir à un germe dentaire innervé.

## Discussion

Les cellules issues de la moelle osseuse expriment des facteurs immunomodulateurs comme TGF- $\beta$ 1, HGF, et IDO1, inhibant la prolifération des cellules T notamment dans la région apicale du germe, en regard du ganglion trigéminal implanté, et permettent ainsi aux fibres nerveuses de pénétrer dans le germe dentaire. Cette hypothèse corrobore les résultats obtenus précédemment chez les souris immunodéprimées Nude, chez lesquelles les germes co-implantés avec un ganglion trigéminal sont innervés une semaine après l'implantation [65].

En termes d'utilisation clinique chez l'humain, cette technique nécessite l'avulsion de dents à un stade de développement spécifique et précoce, qui pourrait être envisageable pour les troisièmes molaires permanentes. La cinétique de développement, le contrôle de la morphologie et de la mise en place fonctionnelle sur l'arcade dentaire des dents obtenues ensuite par bio-ingénierie restent des facteurs limitants.

### **En résumé**

L'utilisation de cellules souches issues de la moelle osseuse dans les réassociations épithélio-mésenchymateuses permet d'obtenir un germe dentaire innervé, après implantation sous-cutanée en association avec un ganglion trigéminal.

Strub M, Keller L, Idoux-Gillet Y, Lesot H, Clauss F, Benkirane-Jessel N, Kuchler-Bopp S.  
Bone Marrow Stromal Cells Promote Innervation of Bioengineered Teeth. *J Dent Res.*  
2018 Sep;97(10):1152-1159. doi: 10.1177/0022034518779077. PMID: 29879365

Strub M, Keller L, Idoux-Gillet Y, Lesot H, Clauss F, Benkirane-Jessel N, Kuchler-Bopp S.  
Bone Marrow Stromal Cells Promote Innervation of Bioengineered Teeth. *J Dent Res.*  
2018 Sep;97(10):1152-1159. doi: 10.1177/0022034518779077. PMID: 29879365

Strub M, Keller L, Idoux-Gillet Y, Lesot H, Clauss F, Benkirane-Jessel N, Kuchler-Bopp S. Bone Marrow Stromal Cells Promote Innervation of Bioengineered Teeth. *J Dent Res*. 2018 Sep;97(10):1152-1159. doi: 10.1177/0022034518779077. PMID: 29879365

Strub M, Keller L, Idoux-Gillet Y, Lesot H, Clauss F, Benkirane-Jessel N, Kuchler-Bopp S.  
Bone Marrow Stromal Cells Promote Innervation of Bioengineered Teeth. *J Dent Res.*  
2018 Sep;97(10):1152-1159. doi: 10.1177/0022034518779077. PMID: 29879365

Strub M, Keller L, Idoux-Gillet Y, Lesot H, Clauss F, Benkirane-Jessel N, Kuchler-Bopp S.  
Bone Marrow Stromal Cells Promote Innervation of Bioengineered Teeth. *J Dent Res.*  
2018 Sep;97(10):1152-1159. doi: 10.1177/0022034518779077. PMID: 29879365

Strub M, Keller L, Idoux-Gillet Y, Lesot H, Clauss F, Benkirane-Jessel N, Kuchler-Bopp S.  
Bone Marrow Stromal Cells Promote Innervation of Bioengineered Teeth. *J Dent Res.*  
2018 Sep;97(10):1152-1159. doi: 10.1177/0022034518779077. PMID: 29879365

Strub M, Keller L, Idoux-Gillet Y, Lesot H, Clauss F, Benkirane-Jessel N, Kuchler-Bopp S. Bone Marrow Stromal Cells Promote Innervation of Bioengineered Teeth. *J Dent Res*. 2018 Sep;97(10):1152-1159. doi: 10.1177/0022034518779077. PMID: 29879365

Strub M, Keller L, Idoux-Gillet Y, Lesot H, Clauss F, Benkirane-Jessel N, Kuchler-Bopp S. Bone Marrow Stromal Cells Promote Innervation of Bioengineered Teeth. *J Dent Res*. 2018 Sep;97(10):1152-1159. doi: 10.1177/0022034518779077. PMID: 29879365

### 2.3. Régénération et innervation d'une molaire en site osseux maxillaire

#### Justification et objectifs expérimentaux

Dans la continuité de l'étude de la régénération osseuse sur modèle de lésion osseuse maxillaire traitée par une biomembrane fonctionnalisée par BMP-2 et afin de se rapprocher d'une application clinique, l'étude du développement de la molaire obtenue par bio-ingénierie s'est poursuivie en site osseux. La fonctionnalité de la dent est directement liée à l'unité os-dent. L'os alvéolaire sert de support à la dent.

Les différents objectifs expérimentaux ont été :

- étude de la viabilité du germe implanté
- évaluation des sites intra-osseux diastémaux et alvéolaires en termes de faisabilité technique,
- potentiel et cinétique de développement du germe et morphogenèse.

#### Matériels et méthodes

Après avoir validé le développement sous-cutané des germes prélevés au 14<sup>ème</sup> jour de développement embryonnaire, l'implantation dans l'os maxillaire a été évaluée dans deux sites distincts :

- implantation dans l'alvéole de la 1<sup>ère</sup> ou 2<sup>ème</sup> molaire maxillaire après avoir avulsé cette dernière ;
- implantation en zone diastémale après création d'une cavité (figure 21).

Afin d'obtenir une innervation de ces germes, une membrane de PCL fonctionnalisée avec de la ciclosporine A (CsA) a été mise en place au fond de la cavité osseuse créée par fraisage.

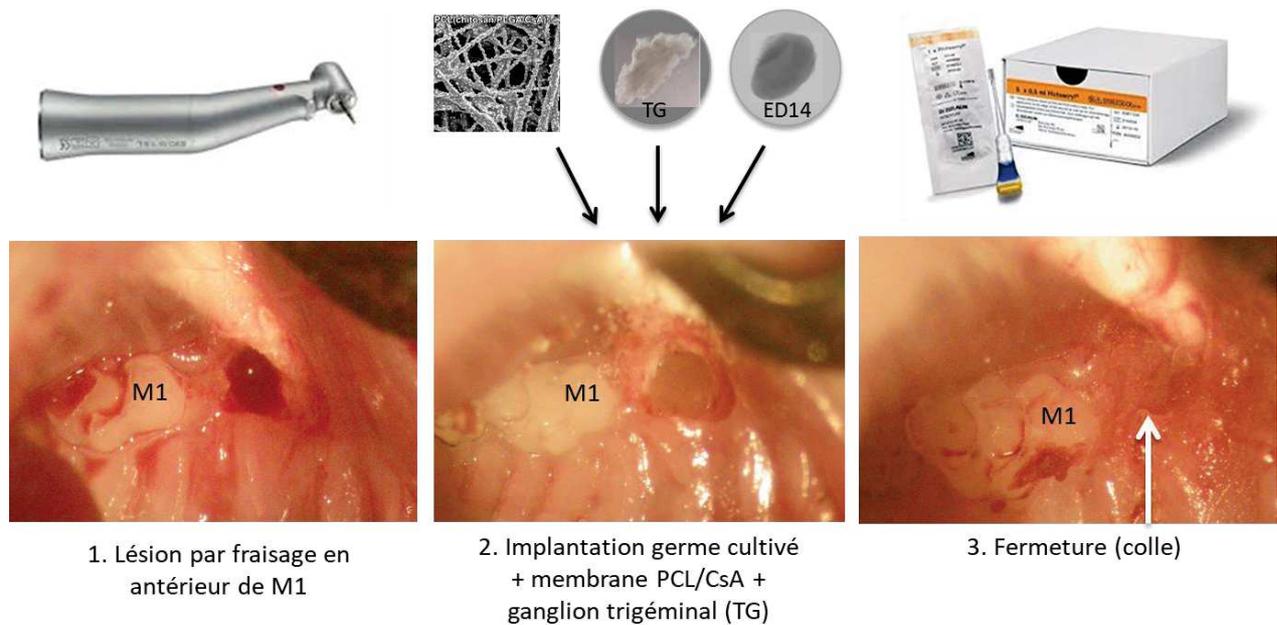


Figure 21 : Protocole d'implantation en site osseux maxillaire.

### Résultats

Les implantations en site alvéolaire extractionnel n'ont pas permis au germe de se développer : dès deux semaines post-opératoires, la membrane de PCL était toujours présente mais le germe était résorbé.

Les germes implantés en zone diastémale poursuivent leur développement et sont innervés.

### Discussion

Deux hypothèses ont été émises quant à la résorption rapide du germe implanté. La première repose sur le fait que les phénomènes de remodelage osseux après l'avulsion d'une dent sont plus importants et rapides qu'après une lésion par forage dans la zone diastémale. Cela est dû au saignement, à l'architecture osseuse et à la présence de cellules souches mésenchymateuses au niveau de la papille apicale. En effet, l'os en zone diastémale est un os basal, compact avec une vascularisation pauvre. Les corticales externes et internes contiennent de l'os médullaire. Pendant la vie embryonnaire, on y trouve de façon physiologique des ébauches de germes dentaires qui vont se développer jusqu'au stade bourgeon avant d'être résorbés [158]. L'os alvéolaire quant à lui est un os spongieux en constant remodelage et qui se résorbe rapidement après une avulsion

dentaire. Sa formation est liée à la présence de germes dentaires et en particulier au follicule dentaire [104].

La seconde hypothèse est liée aux propriétés ostéoinductives de la membrane de PCL qui pourrait avoir accéléré encore davantage la cicatrisation osseuse rapide de l'os alvéolaire, au détriment du développement du germe dentaire.

#### **En résumé**

L'implantation de germes dentaires embryonnaires en site osseux maxillaire diastémal et en association avec un ganglion trigéminal et une membrane de PCL fonctionnalisée avec de la ciclosporine A permet d'obtenir une molaire dans laquelle des fibres nerveuses pénètrent dès la 4<sup>ème</sup> semaine post-opératoire.

Batool F, Strub M, Petit C, Bugueno IM, Bornert F, Clauss F, Huck O, Kuchler-Bopp S, Benkirane-Jessel N. Periodontal Tissues, Maxillary Jaw Bone, and Tooth Regeneration Approaches: From Animal Models Analyses to Clinical Applications. *Nanomaterials* (Basel). 2018 May 16;8(5):337. doi: 10.3390/nano8050337. PMID: 29772691

Batool F, Strub M, Petit C, Bugueno IM, Bornert F, Clauss F, Huck O, Kuchler-Bopp S, Benkirane-Jessel N. Periodontal Tissues, Maxillary Jaw Bone, and Tooth Regeneration Approaches: From Animal Models Analyses to Clinical Applications. *Nanomaterials* (Basel). 2018 May 16;8(5):337. doi: 10.3390/nano8050337. PMID: 29772691

Batool F, Strub M, Petit C, Bugueno IM, Bornert F, Clauss F, Huck O, Kuchler-Bopp S, Benkirane-Jessel N. Periodontal Tissues, Maxillary Jaw Bone, and Tooth Regeneration Approaches: From Animal Models Analyses to Clinical Applications. *Nanomaterials* (Basel). 2018 May 16;8(5):337. doi: 10.3390/nano8050337. PMID: 29772691

Batool F, Strub M, Petit C, Bugueno IM, Bornert F, Clauss F, Huck O, Kuchler-Bopp S, Benkirane-Jessel N. Periodontal Tissues, Maxillary Jaw Bone, and Tooth Regeneration Approaches: From Animal Models Analyses to Clinical Applications. *Nanomaterials* (Basel). 2018 May 16;8(5):337. doi: 10.3390/nano8050337. PMID: 29772691

Batool F, Strub M, Petit C, Bugueno IM, Bornert F, Clauss F, Huck O, Kuchler-Bopp S, Benkirane-Jessel N. Periodontal Tissues, Maxillary Jaw Bone, and Tooth Regeneration Approaches: From Animal Models Analyses to Clinical Applications. *Nanomaterials* (Basel). 2018 May 16;8(5):337. doi: 10.3390/nano8050337. PMID: 29772691

Batool F, Strub M, Petit C, Bugueno IM, Bornert F, Clauss F, Huck O, Kuchler-Bopp S, Benkirane-Jessel N. Periodontal Tissues, Maxillary Jaw Bone, and Tooth Regeneration Approaches: From Animal Models Analyses to Clinical Applications. *Nanomaterials* (Basel). 2018 May 16;8(5):337. doi: 10.3390/nano8050337. PMID: 29772691

Batool F, Strub M, Petit C, Bugueno IM, Bornert F, Clauss F, Huck O, Kuchler-Bopp S, Benkirane-Jessel N. Periodontal Tissues, Maxillary Jaw Bone, and Tooth Regeneration Approaches: From Animal Models Analyses to Clinical Applications. *Nanomaterials* (Basel). 2018 May 16;8(5):337. doi: 10.3390/nano8050337. PMID: 29772691

Batool F, Strub M, Petit C, Bugueno IM, Bornert F, Clauss F, Huck O, Kuchler-Bopp S, Benkirane-Jessel N. Periodontal Tissues, Maxillary Jaw Bone, and Tooth Regeneration Approaches: From Animal Models Analyses to Clinical Applications. *Nanomaterials* (Basel). 2018 May 16;8(5):337. doi: 10.3390/nano8050337. PMID: 29772691

Batool F, Strub M, Petit C, Bugueno IM, Bornert F, Clauss F, Huck O, Kuchler-Bopp S, Benkirane-Jessel N. Periodontal Tissues, Maxillary Jaw Bone, and Tooth Regeneration Approaches: From Animal Models Analyses to Clinical Applications. *Nanomaterials* (Basel). 2018 May 16;8(5):337. doi: 10.3390/nano8050337. PMID: 29772691

Batool F, Strub M, Petit C, Bugueno IM, Bornert F, Clauss F, Huck O, Kuchler-Bopp S, Benkirane-Jessel N. Periodontal Tissues, Maxillary Jaw Bone, and Tooth Regeneration Approaches: From Animal Models Analyses to Clinical Applications. *Nanomaterials* (Basel). 2018 May 16;8(5):337. doi: 10.3390/nano8050337. PMID: 29772691

Batool F, Strub M, Petit C, Bugueno IM, Bornert F, Clauss F, Huck O, Kuchler-Bopp S, Benkirane-Jessel N. Periodontal Tissues, Maxillary Jaw Bone, and Tooth Regeneration Approaches: From Animal Models Analyses to Clinical Applications. *Nanomaterials* (Basel). 2018 May 16;8(5):337. doi: 10.3390/nano8050337. PMID: 29772691

Batool F, Strub M, Petit C, Bugueno IM, Bornert F, Clauss F, Huck O, Kuchler-Bopp S, Benkirane-Jessel N. Periodontal Tissues, Maxillary Jaw Bone, and Tooth Regeneration Approaches: From Animal Models Analyses to Clinical Applications. *Nanomaterials* (Basel). 2018 May 16;8(5):337. doi: 10.3390/nano8050337. PMID: 29772691

Batool F, Strub M, Petit C, Bugueno IM, Bornert F, Clauss F, Huck O, Kuchler-Bopp S, Benkirane-Jessel N. Periodontal Tissues, Maxillary Jaw Bone, and Tooth Regeneration Approaches: From Animal Models Analyses to Clinical Applications. *Nanomaterials* (Basel). 2018 May 16;8(5):337. doi: 10.3390/nano8050337. PMID: 29772691

Batool F, Strub M, Petit C, Bugueno IM, Bornert F, Clauss F, Huck O, Kuchler-Bopp S, Benkirane-Jessel N. Periodontal Tissues, Maxillary Jaw Bone, and Tooth Regeneration Approaches: From Animal Models Analyses to Clinical Applications. *Nanomaterials* (Basel). 2018 May 16;8(5):337. doi: 10.3390/nano8050337. PMID: 29772691

Batool F, Strub M, Petit C, Bugueno IM, Bornert F, Clauss F, Huck O, Kuchler-Bopp S, Benkirane-Jessel N. Periodontal Tissues, Maxillary Jaw Bone, and Tooth Regeneration Approaches: From Animal Models Analyses to Clinical Applications. *Nanomaterials* (Basel). 2018 May 16;8(5):337. doi: 10.3390/nano8050337. PMID: 29772691

Batool F, Strub M, Petit C, Bugueno IM, Bornert F, Clauss F, Huck O, Kuchler-Bopp S, Benkirane-Jessel N. Periodontal Tissues, Maxillary Jaw Bone, and Tooth Regeneration Approaches: From Animal Models Analyses to Clinical Applications. *Nanomaterials* (Basel). 2018 May 16;8(5):337. doi: 10.3390/nano8050337. PMID: 29772691

---

Chapitre II

Régénération osseuse maxillaire

---

### 3. Régénération osseuse maxillaire

#### 3.1. Régénération osseuse maxillaire chez la souris Wild Type (WT) et chez la souris Tabby

##### Justification-objectifs expérimentaux et hypothèse de travail

La préparation d'un site osseux propice au développement d'un germe dentaire obtenu par bio-ingénierie est nécessaire. En effet le tissu osseux est indissociable des processus d'éruption (voir chapitre 3) et sert de support à l'organe dentaire. Les fibres du ligament parodontal constituent l'interface entre le cément radiculaire et l'os alvéolaire. Des modifications morphologiques sont observées au niveau osseux lors de l'éruption, des déplacements orthodontiques, de processus infectieux ou encore après l'avulsion de l'organe dentaire qui s'accompagne d'une résorption de l'os alvéolaire [139].

La souris Tabby (Ta) est un modèle murin de la dysplasie ectodermique liée à l'X (DEX), maladie rare comprenant des anomalies des dérivés ectodermiques et du métabolisme osseux [16,66].

Les patients souffrant de dysplasie ectodermique présentent un tableau clinique d'oligodontie voire d'anodontie [21]. Une prise en charge implantaire précoce est donc nécessaire et complexe du fait de la faible quantité d'os disponible et de la physiopathologie du remodelage osseux [9,70].

##### Matériels et méthodes

Des lésions osseuses maxillaires ont été créées afin de comparer la cinétique de la cicatrisation osseuse dans un contexte normal et dans un contexte de pathologie du métabolisme osseux d'origine génétique (figure 22). Le protocole micro-chirurgical utilisé a permis la standardisation des lésions réalisées par fraisage sous binoculaire et anesthésie générale par injection intra-péritonéale de kétamine/xylazine (100mg/kg de kétamine et 10mg/kg de xylazine) avec une optimisation de la reproductibilité des expérimentations et un seul opérateur réalisant les lésions chirurgicales (absence de variabilité inter-opérateur).

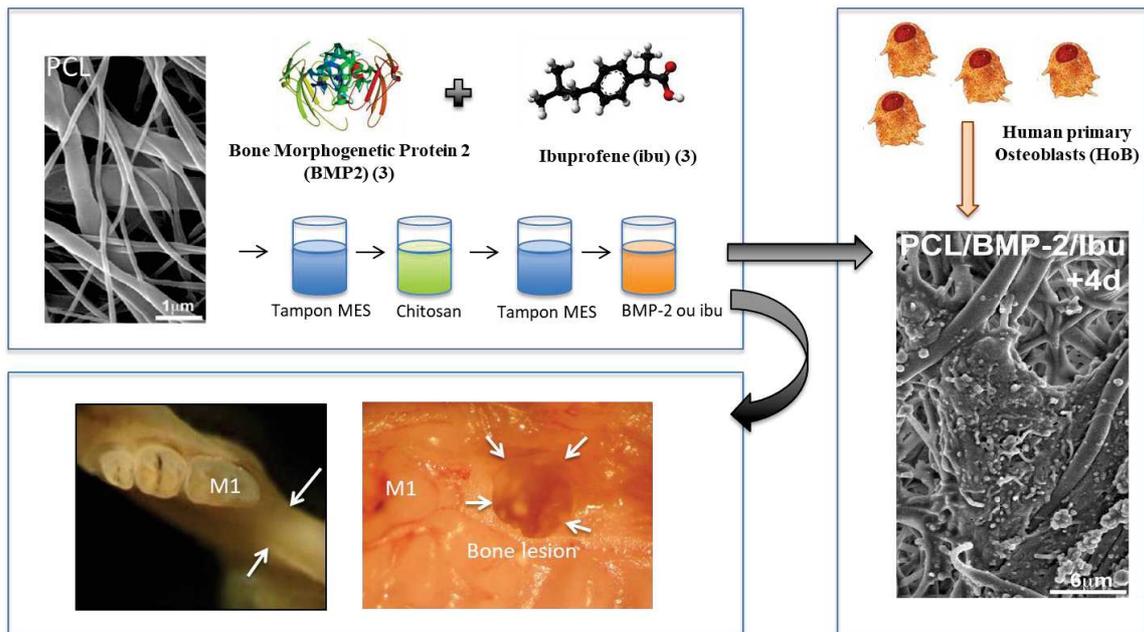


Figure 22 : Régénération osseuse maxillaire et membrane PCL-BMP-2-ibuprofène : protocole.

Des membranes nanofibreuses de PCL fonctionnalisées avec de la BMP-2 et de l'ibuprofène ont été implantées dans le but de stimuler la néoformation du tissu osseux, dont la cinétique a été suivie par micro-CT. Ces membranes et la distribution topographique des nanoréservoirs incorporant la BMP-2 ont été caractérisées en microscopie électronique à balayage (MEB) et leur biocompatibilité a été évaluée notamment par la culture d'ostéoblastes humains à la surface membranaire (figure 22).

### Résultats

Les résultats ont mis en évidence que l'utilisation de ces membranes chez la souris WT stimulait la réponse osseuse, alors que chez la souris Tabby la néoformation osseuse est d'abord ralentie par ces membranes, ce qui correspond à un effet négatif de la mutation *Ta* sur la cicatrisation osseuse dans ce contexte.

Discussion : La principale difficulté rencontrée chez le modèle murin est la hauteur et la largeur d'os disponible au maxillaire. En effet, la faible quantité d'os disponible complexifie l'approche chirurgicale avec le risque de créer une communication bucco-nasale avec un fraisage trop important. Pour les mêmes raisons, un geste chirurgical au niveau mandibulaire est encore plus délicat. La qualité de l'os néoformé (structure,

densité, propriétés mécaniques) doit faire l'objet de travaux ultérieurs dans la mesure où ces paramètres sont essentiels à maîtriser lors de réhabilitations prothétiques chez l'Homme.

**En résumé**

Les membranes de PCL fonctionnalisées avec de la BMP-2 et de l'ibuprofène stimule la cicatrisation osseuse chez les souris WT et au contraire ralentit la régénération osseuse chez la souris Ta, modèle de dysplasie ectodermique.

Strub M, Van Bellinghen X, Fioretti F, Bornert F, Benkirane-Jessel N, Idoux-Gillet Y, Kuchler-Bopp S, Clauss F. Maxillary Bone Regeneration Based on Nanoreservoirs Functionalized  $\epsilon$ -Polycaprolactone Biomembranes in a Mouse Model of Jaw Bone Lesion. *Biomed Res Int.* 2018 Feb 26;2018:7380389. doi: 10.1155/2018/7380389. eCollection 2018. PMID: 29682553

Strub M, Van Bellinghen X, Fioretti F, Bornert F, Benkirane-Jessel N, Idoux-Gillet Y, Kuchler-Bopp S, Clauss F. Maxillary Bone Regeneration Based on Nanoreservoirs Functionalized  $\epsilon$ -Polycaprolactone Biomembranes in a Mouse Model of Jaw Bone Lesion. *Biomed Res Int*. 2018 Feb 26;2018:7380389. doi: 10.1155/2018/7380389. eCollection 2018. PMID: 29682553

Strub M, Van Bellinghen X, Fioretti F, Bornert F, Benkirane-Jessel N, Idoux-Gillet Y, Kuchler-Bopp S, Clauss F. Maxillary Bone Regeneration Based on Nanoreservoirs Functionalized  $\epsilon$ -Polycaprolactone Biomembranes in a Mouse Model of Jaw Bone Lesion. *Biomed Res Int*. 2018 Feb 26;2018:7380389. doi: 10.1155/2018/7380389. eCollection 2018. PMID: 29682553

Strub M, Van Bellinghen X, Fioretti F, Bornert F, Benkirane-Jessel N, Idoux-Gillet Y, Kuchler-Bopp S, Clauss F. Maxillary Bone Regeneration Based on Nanoreservoirs Functionalized  $\epsilon$ -Polycaprolactone Biomembranes in a Mouse Model of Jaw Bone Lesion. *Biomed Res Int*. 2018 Feb 26;2018:7380389. doi: 10.1155/2018/7380389. eCollection 2018. PMID: 29682553

Strub M, Van Bellinghen X, Fioretti F, Bornert F, Benkirane-Jessel N, Idoux-Gillet Y, Kuchler-Bopp S, Clauss F. Maxillary Bone Regeneration Based on Nanoreservoirs Functionalized  $\epsilon$ -Polycaprolactone Biomembranes in a Mouse Model of Jaw Bone Lesion. *Biomed Res Int*. 2018 Feb 26;2018:7380389. doi: 10.1155/2018/7380389. eCollection 2018. PMID: 29682553

Strub M, Van Bellinghen X, Fioretti F, Bornert F, Benkirane-Jessel N, Idoux-Gillet Y, Kuchler-Bopp S, Clauss F. Maxillary Bone Regeneration Based on Nanoreservoirs Functionalized  $\epsilon$ -Polycaprolactone Biomembranes in a Mouse Model of Jaw Bone Lesion. *Biomed Res Int*. 2018 Feb 26;2018:7380389. doi: 10.1155/2018/7380389. eCollection 2018. PMID: 29682553

Strub M, Van Bellinghen X, Fioretti F, Bornert F, Benkirane-Jessel N, Idoux-Gillet Y, Kuchler-Bopp S, Clauss F. Maxillary Bone Regeneration Based on Nanoreservoirs Functionalized  $\epsilon$ -Polycaprolactone Biomembranes in a Mouse Model of Jaw Bone Lesion. *Biomed Res Int*. 2018 Feb 26;2018:7380389. doi: 10.1155/2018/7380389. eCollection 2018. PMID: 29682553

Strub M, Van Bellinghen X, Fioretti F, Bornert F, Benkirane-Jessel N, Idoux-Gillet Y, Kuchler-Bopp S, Clauss F. Maxillary Bone Regeneration Based on Nanoreservoirs Functionalized  $\epsilon$ -Polycaprolactone Biomembranes in a Mouse Model of Jaw Bone Lesion. *Biomed Res Int*. 2018 Feb 26;2018:7380389. doi: 10.1155/2018/7380389. eCollection 2018. PMID: 29682553

Strub M, Van Bellinghen X, Fioretti F, Bornert F, Benkirane-Jessel N, Idoux-Gillet Y, Kuchler-Bopp S, Clauss F. Maxillary Bone Regeneration Based on Nanoreservoirs Functionalized  $\epsilon$ -Polycaprolactone Biomembranes in a Mouse Model of Jaw Bone Lesion. *Biomed Res Int*. 2018 Feb 26;2018:7380389. doi: 10.1155/2018/7380389. eCollection 2018. PMID: 29682553

Strub M, Van Bellinghen X, Fioretti F, Bornert F, Benkirane-Jessel N, Idoux-Gillet Y, Kuchler-Bopp S, Clauss F. Maxillary Bone Regeneration Based on Nanoreservoirs Functionalized  $\epsilon$ -Polycaprolactone Biomembranes in a Mouse Model of Jaw Bone Lesion. *Biomed Res Int*. 2018 Feb 26;2018:7380389. doi: 10.1155/2018/7380389. eCollection 2018. PMID: 29682553

Strub M, Van Bellinghen X, Fioretti F, Bornert F, Benkirane-Jessel N, Idoux-Gillet Y, Kuchler-Bopp S, Clauss F. Maxillary Bone Regeneration Based on Nanoreservoirs Functionalized  $\epsilon$ -Polycaprolactone Biomembranes in a Mouse Model of Jaw Bone Lesion. *Biomed Res Int*. 2018 Feb 26;2018:7380389. doi: 10.1155/2018/7380389. eCollection 2018. PMID: 29682553

Strub M, Van Bellinghen X, Fioretti F, Bornert F, Benkirane-Jessel N, Idoux-Gillet Y, Kuchler-Bopp S, Clauss F. Maxillary Bone Regeneration Based on Nanoreservoirs Functionalized  $\epsilon$ -Polycaprolactone Biomembranes in a Mouse Model of Jaw Bone Lesion. *Biomed Res Int.* 2018 Feb 26;2018:7380389. doi: 10.1155/2018/7380389. eCollection 2018. PMID: 29682553

3.2. Les membranes PCL-BMP-2 : effet sur la régénération osseuse à moyen terme  
(voir article page 66)

### Justification

Dans les travaux précédents, la fermeture de la lésion osseuse n'ayant pas été obtenue à la fin de la période de suivi (30 jours), nous avons alors étudié la régénération osseuse sur des temps de cicatrisation plus longs, allant jusqu'à 90 jours post-opératoires.

### Objectif

L'objectif était d'évaluer la vitesse de cicatrisation osseuse maxillaire en présence de membranes PCL fonctionnalisées, et ce jusqu'à fermeture de la brèche osseuse.

### Matériels et méthode

L'intervention chirurgicale a été réalisée chez des souris WT en comparant à nouveau les membranes PCL fonctionnalisées avec de la BMP-2, de la BMP-2 et de l'ibuprofène, ou non fonctionnalisées. Le suivi de la cicatrisation a été effectué par imagerie micro-CT et par des techniques histologiques. Les images obtenues permettent de confirmer les résultats obtenus en histologie, d'évaluer la densité de l'os néoformé et de réaliser des mesures volumiques.

### Résultats

La BMP-2 en association avec l'ibuprofène donne les meilleurs résultats avec une fermeture de la brèche osseuse plus précoce (90 jours).

### Discussion

La qualité de l'os néoformé et notamment ses propriétés ultra-structurales restent à analyser, notamment par une approche de micro-CT à haute résolution (Synchrotron Radiation micro-CT : SR-micro-CT). Le temps nécessaire à la formation d'os néoformé dans l'ensemble de la lésion est en cours d'évaluation. Il est cependant peu probable de pouvoir régénérer le volume osseux pré-lésionnel du fait de la taille critique de la lésion qui s'accompagne d'une résorption au niveau du tissu osseux avoisinant la lésion, se traduisant par un affaissement des tissus minéralisés objectivable sur l'imagerie micro-CT. Toutefois, ce modèle lésionnel permet une approche expérimentale de la cinétique

d'ostéogenèse et de l'influence de la biomembrane fonctionnalisée et du fond génétique de la souris (souris WT ou mutante Ta).

**En résumé**

En matière de fermeture de la brèche osseuse réalisée par fraisage, la mise en place de membrane fonctionnalisée avec de la BMP-2 et de l'ibuprofène donne des résultats supérieurs à la fonctionnalisation avec de la BMP-2 ou à l'utilisation de membranes de PCL non fonctionnalisées.

---

Chapitre III  
Eruption dentaire

---

#### 4. Les mécanismes biologiques de l'éruption dentaire

Une dent n'est fonctionnelle que si elle a fait son éruption dans la cavité buccale et qu'elle est en contact avec une dent de l'arcade antagoniste afin d'assurer la fonction masticatoire.

##### 4.1. Les théories de l'éruption

Les théories expliquant les processus d'éruption dentaire se sont succédé, plaçant l'une ou l'autre structure au cœur de ce processus, tandis qu'à l'heure actuelle les chercheurs tendent à un consensus : l'éruption dentaire serait liée à de nombreuses interactions entre des tissus dentaires et périodontaires. Les mécanismes sont régulés dans le temps et dans l'espace, sur le plan moléculaire et cellulaire. Il faut garder à l'esprit que les mouvements dentaires pré-éruptifs ont lieu dans les trois dimensions de l'espace et pas uniquement dans le sens vertical [84].

D'anciennes théories de l'éruption évoquaient des "forces propulsives" liées à la croissance radiculaire. Ces hypothèses sont caduques : les dents sans racines ou avec des racines courtes font leur éruption, c'est par exemple le cas chez les patients présentant des antécédents d'irradiation maxillo-faciale [84]. De plus, des travaux chez le chien ont mis en évidence la poursuite des processus éruptifs même après résection des racines dentaires [11]. La théorie selon laquelle la poussée axiale serait due uniquement à l'apposition de tissu osseux apicalement au germe est également écartée. En effet, une activité de résorption osseuse synchrone est nécessaire. Chez les modèles animaux d'ostéopétrose, l'éruption n'a pas lieu alors que l'activité ostéoblastique est normale [82,140]. Pour les mêmes raisons, la théorie du ligament parodontal a été abandonnée. La formation du chemin d'éruption intra-osseux, lié à l'activité ostéoclastique, est indispensable à l'éruption mais pas suffisant [45]. L'administration d'inhibiteurs de la résorption osseuse comme les biphosphonates chez le jeune rat retarde ou empêche l'éruption dentaire au niveau des molaires comme des incisives [42].

Nous ne traiterons pas des dents à croissance continue dans ce manuscrit, dans la mesure où nos travaux ne concernaient que les molaires, dans l'optique de s'approcher ultérieurement d'une application clinique chez l'Homme.

#### 4.2. Tissus dentaires et périodontaires impliqués dans les processus d'éruption

##### 4.2.1. Le follicule dentaire (FD)

L'éruption dentaire est un processus multifactoriel hautement régulé, principalement par le follicule dentaire ou sac folliculaire [11]. Issu des cellules des crêtes neurales céphaliques, le follicule dentaire entoure l'organe de l'émail depuis le stade de cupule. Il est localisé entre l'os alvéolaire et le germe dentaire. Les cellules du FD forment le ligament alvéolo-dentaire ou ligament parodontal, du cément et de l'os alvéolaire [169]. Le FD est indispensable pour l'éruption, en effet des travaux de Cahill et Marks (1980) ont mis en évidence l'absence d'éruption en cas de résection expérimentale du FD chez le chien [11]. En effet, ils ont noté une absence de formation du chemin d'éruption intra-osseux et une activité ostéoblastique faible dans la région apicale du germe.

Le FD est un tissu conjonctif lâche comportant des cellules souches mésenchymateuses multipotentes capables de se différencier en ostéoblastes, adipocytes, chondrocytes et cellules neurales [106,148,169]. Elles présentent un taux de prolifération élevé et des propriétés immunomodulatrices qui les rendent particulièrement intéressantes en ingénierie tissulaire [157]. La prolifération, la différenciation et la migration des cellules du FD sont sous la dépendance de signaux issus de la gaine épithéliale de Hertwig. La plupart des cellules du FD expriment alternativement des marqueurs de surface des MSCs comme NOTCH-1, STRO-1, CD13, CD44, CD73, CD105, CD56, CD271 et HLA-ABC [169]. NOTCH-1 est une protéine transmembranaire régulant notamment le renouvellement et la prolifération des cellules du FD en agissant sur la transition G1/S et sur l'activité télomérase [18]. Des marqueurs des cellules souches de la crête neurale sont également retrouvés (P75, HnK1), mais aussi des marqueurs des cellules neurales (nestine, beta-III-tubuline) et gliales (GFAP) [169].

Le FD possède des propriétés immunomodulatrices : par exemple les cellules qui le composent présentent des récepteurs Toll-like (TLR). Ce sont des récepteurs que l'on retrouve sur les cellules immunitaires et qui jouent un rôle dans le lien entre l'immunité innée et l'immunité acquise. Les cellules du FD sont capables de sécréter des cytokines qui vont limiter la prolifération lymphocytaire et l'apoptose des lymphocytes T [169].

Le FD est un tissu cible qui reçoit les signaux moléculaires en provenance du germe dentaire, en particulier du réticulum stellaire (figure 23) [147].

Figure 23 : La signalisation paracrine entre le réticulum étoilé et le follicule dentaire (DF) entraîne la synthèse et la sécrétion de molécules chimiotactiques, du facteur 1 de stimulation des colonies (CSF-1) et de la protéine chimiotactique monocyttaire 1 (MCP-1) pour le recrutement de cellules mononucléaires (selon Wise *et al.*, 2002) [147].

#### 4.2.2. Le réticulum stellaire (RS)

Le réticulum stellaire ou réticulum étoilé tient son nom des cellules qui le composent et qui ont une forme d'étoiles. C'est une niche cellulaire présente à partir du stade capuchon du développement dentaire et contenant notamment des cellules souches [73,88]. On trouve le réticulum stellaire entre l'épithélium adamantin interne (EAI) et l'épithélium adamantin externe (EAE) qui sont en continuité et forment une « zone de réflexion ». Ces trois structures forment l'organe de l'émail [73]. L'organe de l'émail est une structure

épithéliale complexe qui joue un rôle déterminant dans la détermination de la morphologie mais aussi dans l'éruption de la dent.

TGF $\beta$ 1 est retrouvé dans le RS et augmente l'expression de CSF-1 (Colony-Stimulating Factor-1) et MCP-1 (Monocyte Chemoattractant Protein 1) dans le FD, et dont le rôle dans l'éruption est décrit plus bas. Le rôle du RS sur l'expression des gènes du FD est essentiellement paracrine [147].

Le RS joue également un rôle clé dans l'établissement de la couche papillaire, qui est un réseau de kératine entre l'épithélium oral et la couronne dentaire. La continuité de cette couche épithéliale est essentielle pour faciliter l'éruption et constituer une barrière de protection contre les agents pathogènes qui pourraient coloniser le site d'éruption et être à l'origine d'une inflammation de type péri coronarite [73].

#### 4.2.3. L'os alvéolaire

De façon concomitante à l'éruption de la dent, une apposition d'os alvéolaire a lieu apicalement au germe dentaire tandis que coronairement l'activité ostéoclastique est à l'origine de la formation d'un chemin d'éruption intra-osseux visible radiologiquement [149]. Les signaux moléculaires envoyés par le FD sont à l'origine du recrutement de cellules mononucléées qui fusionnent pour former des ostéoclastes, au niveau du tiers coronaire de la crypte osseuse (figure 23). Les molécules chimiotactiques impliquées sont CSF-1 et MCP-1, sécrétées au niveau du FD [41,114].

Apicalement au germe, on note une augmentation du nombre d'ostéoblastes. La différenciation des ostéoblastes à partir des cellules mésenchymateuses du FD est notamment sous la dépendance de BMP-2, BMP-7 et RUNX-2. Une activité ostéogénique insuffisante dans la région apicale peut compromettre l'éruption [149], tout comme une activité ostéoclastique altérée dans la région coronaire. En effet, certains rats ostéopérotiques présentent des défauts d'éruption dentaire [22,52].

#### 4.2.4. Le ligament parodontal

Le ligament parodontal est issu du FD. La PLAP-1 (Periodontal Ligament-Associated Protein 1) est un régulateur de la différenciation ostéogénique que l'on trouve au niveau des cellules du ligament parodontal. En 2019, Yu et coll. ont mis en évidence son rôle dans les processus d'éruption dentaire [163]. En effet, son expression augmente pendant les phases de formation du chemin d'éruption intra-osseux et sa distribution au niveau occlusal du germe est semblable à celle de RANKL (Receptor Activator of NF-kB Ligand). Sa localisation est identique aux ostéoclastes marqués au CD68.

### 4.3. Les molécules impliquées dans les processus d'éruption

#### 4.3.1. Les BMPs (Bone Morphogenetic Proteins)

Bien qu'il existe une vingtaine d'isoformes de BMPs modulant la différenciation ostéogénique, les plus étudiées pour leur rôle dans la différenciation des cellules du FD sont BMP-2, BMP-4, BMP-6, BMP-7 et BMP-9. La synthèse d'os alvéolaire dans la région apicale du germe dentaire est indispensable à son éruption [149].

- BMP-2 /BMP-7

BMP-2 et BMP-7 vont réguler temporellement et de façon dose-dépendante la différenciation des cellules du FD en ostéoblastes. BMP-2 est essentielle dans les premiers stades de la différenciation [169].

- BMP-4

BMP-4 intervient au début de la différenciation des cellules du FD en ostéoblastes.

- BMP-6

Contrairement à la BMP-2 et à la BMP-4, la BMP-6 joue un rôle tout au long de la différenciation des cellules du FD en ostéoblastes. Elle est exprimée dans la moitié basale du FD mais aussi au niveau du ligament parodontal et des cémentoblastes [101]. Son expression dans la moitié basale du FD augmente fortement quelques jours avant l'éruption [149].

#### 4.3.2. La voie Parathyroid Hormone related Peptide (PTHrP)- Parathyroïde Hormone (PTH) – Parathyroïde Hormone Receptor 1 (PTHR1)

- PTHrP

PTHrP est un des ligands susceptibles de se fixer sur le récepteur PTHR1 par son action autocrine ou paracrine [131]. Il est synthétisé dans de nombreux tissus. Il est indispensable pour l'éruption dentaire [109]. On le retrouve essentiellement dans les cellules du FD et à la surface des racines pendant les phases d'éruption. Ce peptide joue un rôle dans la régulation autocrine de la différenciation des cellules mésenchymateuses du FD [131]. Les cellules du FD qui expriment PTHrP se différencient en cellules du ligament parodontal, en ostéoblastes ou en cémentoblastes [169].

- PTH

L'hormone parathyroïdienne a une structure relativement similaire à PTHrP puisqu'elle présente une homologie partielle dans sa portion terminale NH<sub>2</sub> [136]. PTH est produite par la glande parathyroïdienne et agit principalement sur les reins et le tissu osseux. Elle va stimuler plusieurs facteurs intracellulaires dont l'adénosine monophosphate cyclique (cAMP), le phosphate d'inositol et le calcium, et activer les protéines kinases A (figure 24) [7,17,136].

Figure 24 : Diagramme récapitulatif des voies médiées par les protéines G activées par la PTH (selon Bastepe *et al.*,2017) [7].

- PTHR1 ou PPR (PTH/PTHrP receptor)

PTHR1 est le récepteur de PTH et PTHrP couplé à une protéine G. Il possède 7 domaines transmembranaires. On le trouve essentiellement au niveau des ostéoblastes, des cellules tubulaires rénales et des composantes mésenchymateuses des dents. Ses principaux rôles sont d'agir pour le maintien de l'homéostasie phospho-calcique et le remodelage osseux. Ses deux ligands ont une affinité identique pour leur récepteur [131].

Chez l'Homme une mutation du gène codant pour PTHR1 ayant pour conséquence son activation est à l'origine d'une chondrodysplasie métaphysaire de Jansen caractérisée par une ossification endochondrale retardée [123], ainsi que d'une enchondromatose (maladie d'Ollier) [23].

#### 4.3.3. La voie de signalisation WNT

Les WNTs sont des glycoprotéines qui participent à la régulation de la prolifération, de la différenciation et de la migration des cellules souches [169]. Elles interviennent dans les interactions épithélio-mésenchymateuses au cours du développement dentaire.

L'isoforme WNT5A est exprimé précocement par les cellules du FD, en particulier entre le 1<sup>er</sup> et le 11<sup>ème</sup> jour de vie chez l'Homme. *In vitro*, WNT3A inhibe l'expression de RUNX2 et de l'ostéocalcine (OCN) et empêche la différenciation des ostéoblastes induite par BMP-2 [169].

#### 4.3.4. RUNX2

RUNX2 est exprimé dans le follicule dentaire. Il module l'expression de plusieurs marqueurs ostéoblastiques comme ostérix, ostéopontine, BSP, ostéocalcine et le collagène de type I [106]. Son rôle dans la différenciation ostéogénique des cellules du FD a été démontré. Il est essentiel pour le remodelage osseux pendant les phases d'éruption [74].

La mutation du facteur de transcription de RUNX2 peut s'exprimer chez l'Homme par une dysplasie cléido-crânienne caractérisée par un spectre phénotypique associant anomalies de l'éruption dentaire et anomalies squelettiques [169].

#### 4.3.5. La calcitonine (CT)

La calcitonine est un peptide de 32 acides aminés sécrétée par la glande thyroïde. Elle joue un rôle dans l'homéostasie calcique, notamment sur l'inhibition de la résorption osseuse en agissant sur les ostéoclastes. En effet, en inhibant l'expression de RANKL, la CT empêche la différenciation ostéoclastique. Elle a également un contrôle direct sur les ostéoclastes qui ont un récepteur de la calcitonine : l'activation du récepteur conduit à l'inhibition du développement et de la fonction des ostéoclastes [115].

#### 4.3.6. La voie RANK – RANKL -OPG (ostéoprotégérine)

RANK est un membre de la superfamille des récepteurs du facteur de nécrose tumorale (TNF). Son ligand, RANKL, est une protéine transmembranaire dont la partie extracellulaire est clivée par des enzymes de type métalloprotéases et libérée sous forme soluble dans l'environnement extra-cellulaire, RANKL jouant un rôle biologique central dans les processus d'ostéoclastogenèse et l'homéostasie osseuse (figure 25) [100].

Il existe une compétition entre OPG, inhibiteur endogène, et RANKL pour la fixation sur RANK. L'activation de RANK par la fixation de RANKL induit la différenciation des monocytes en ostéoclastes. RANKL est principalement exprimé par les ostéocytes et les ostéoblastes [100].

Au 5<sup>ème</sup> jour de vie chez la souris, quand l'activité des ostéoclastes est élevée dans la région occlusale au germe, on note une expression importante de RANKL par rapport à OPG, et la tendance inverse dans la région basale [137]. Puis au 8<sup>ème</sup> jour, l'activité ostéoclastique décroît avec une augmentation de l'expression d'OPG dans les régions occlusales et basales [49].

Certaines mutations de RANKL peuvent conduire à une ostéopétrose [100]. Tandis que des mutations d'OPG peuvent être à l'origine d'une accélération du remodelage osseux comme dans la maladie de Paget [111].

#### 4.3.7. CSF-1

CSF-1 ou M-CSF (Macrophage Colony-Stimulating Factor) est une cytokine exprimée dans le FD et qui joue un rôle primordial dans l'ostéoclastogenèse, *via* le recrutement et la prolifération des précurseurs des ostéoclastes [42,160] (figure 25). PDGF-BB (Platelet-Derived Growth Factor BB) et bFGF (basic Fibroblast Growth Factor) augmentent l'expression de CSF-1 [10].

L'activité ostéoclastique dans la région occlusale au germe est maximale au 5<sup>ème</sup> jour de vie chez la souris et corrélée avec un taux élevé de CSF-1 et de RANKL. Il pourrait y avoir une diminution de l'expression d'OPG médiée par CSF-1 [151].

Au même moment, dans la région apicale au germe, l'activité des ostéoclastes est faible malgré l'expression de CSF-1, mais il est noté un taux élevé d'OPG par rapport à RANKL [49].

Chez le rat, l'injection de CSF-1 au moment du pic de recrutement des cellules mononucléées par le FD, c'est-à-dire dès les premiers jours de vie, accélère l'éruption des molaires [42].

#### 4.3.8. MCP-1

MCP-1 est une protéine sécrétée par le FD et impliquée dans le chimiotactisme des précurseurs mononucléaires des ostéoclastes, à l'image de CSF-1 mais plus précocement au cours du développement [10]. EGF (Epidermal Growth Factor), TGF $\beta$ , CSF-1, Il-1 $\alpha$ , PDGF-BB et bFGF augmentent l'expression de MCP-1 *in vitro* et *in vivo* [10,114,151,152].

#### 4.3.9. EGF (Epidermal Growth Factor)

EGF est localisé dans le FD, l'os alvéolaire et les améloblastes avant et pendant les premières phases de l'éruption, jusqu'au 9<sup>ème</sup> jour de vie de la souris. Le récepteur de l'EGF a été mis en évidence au niveau coronaire du FD au 9<sup>ème</sup> jour, suggérant une régulation temporelle de l'éruption par EGF [125].

Cielinski et coll. (1995) ont montré que l'injection post-natale d'EGF accélère l'éruption des incisives mais pas des molaires, et que l'injection de CSF-1 accélère davantage l'éruption des molaires que des incisives, suggérant une régulation des processus d'éruption différente entre les molaires et les incisives [20]. EGF n'a pas d'effet direct sur le recrutement des cellules ostéoclastiques à la jonction entre le FD et l'os alvéolaire, contrairement à CSF-1.

#### 4.3.10. VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor)

VEGF est exprimé dans le follicule dentaire, en particulier juste avant l'éruption. Des travaux ont mis en évidence que VEGF stimule l'expression de RANK au niveau des précurseurs ostéoclastiques. C'est l'association de VEGF et CSF-1 qui favorise l'ostéoclastogénèse et la prolifération des précurseurs ostéoclastiques, mais pas l'expression de VEGF seul [160].

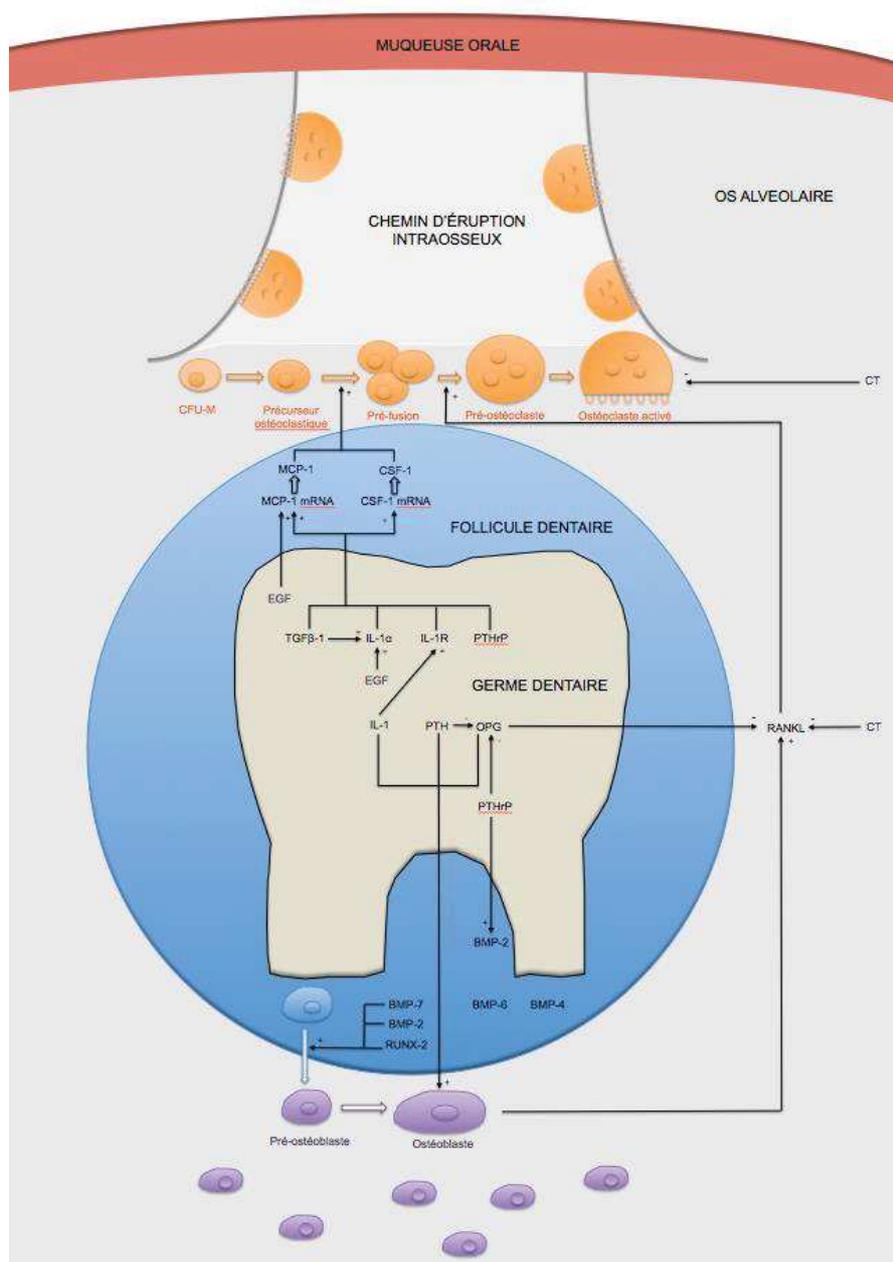


Figure 25 : Représentation schématique des principales interactions moléculaires impliquées dans les processus d'éruption dentaire

#### 4.4. Etude de la cinétique de l'éruption des molaires chez la souris

##### 4.4.1. Introduction

A la naissance, les molaires du souriceau n'ont pas encore fait leur éruption dans la cavité buccale. Les processus éruptifs se mettent en place et en parallèle la morphogenèse se poursuit. Dès PN10, les mouvements du germe en direction occlusale lui permettent de se placer sous l'épithélium oral [78]. Un chemin d'éruption se forme par résorption de l'os alvéolaire médiée par l'activation des ostéoclastes. Une apposition de tissu osseux a lieu dans la région apicale, en particulier dans la zone de furcation. Les tissus mous situés en regard de la dent s'amincissent et l'épithélium oral fini par fusionner avec l'organe de l'émail. L'apoptose des tissus mous en regard des cuspides permet à la dent de franchir la barrière muqueuse en moyenne à PN16 [78].

##### 4.4.2. Objectif expérimental

L'objectif était de déterminer avec précision la cinétique de l'éruption dentaire chez la lignée de souris BALB/C entretenue pour l'UMR1260 à l'Animalerie Centrale de la Faculté de Médecine de Strasbourg.

##### 4.4.3. Matériels et méthodes

Des nouveaux-nés de souris ont été mis à mort par décapitation ou injection d'un excès d'anesthésiques (Euthasol) à différents temps de vie (PN1, 3, 6, 9, 12, 16, 20, 30) pour suivre la cinétique d'éruption des molaires maxillaires et mandibulaires. Les échantillons ont été fixés dans du paraformaldéhyde (PFA) à 4% pendant une nuit. La déminéralisation a été réalisée selon le protocole suivant :

- rinçage à l'eau distillée 3x10 min
- immersion dans du décalcifiant LEICA® 3h à 37°C sous agitation (pH=1)
- rinçage à l'eau distillée 3x10 min
- rinçage au PBS sans calcium et sans magnésium pendant 1 nuit sous agitation, à température ambiante.

Les échantillons ont ensuite été déshydratés et fixés en paraffine pour être coupés au microtome. Les coupes histologiques de 10 µm d'épaisseur ont été réalisées et colorées à l'hématoxyline/éosine, avant d'être observées au microscope (LEICA® DM4000B).

Les échantillons destinés à l'analyse immuno-histo-chimique ont quant à eux été placés dans de l'OCT (Thermo Fisher®, UK) avant congélation. Des coupes de 10 µm d'épaisseur ont été réalisées au cryostat et marquées avec des anticorps anti-PTHR1.

#### 4.4.4. Résultats

Dans les premiers jours de vie, la couronne dentaire poursuit son édification débutée *in utero*. On observe une cinétique de développement relativement synchrone entre les premières molaires mandibulaires et les premières molaires maxillaires (figure 26 : A1 et A2). L'édification de la racine débute alors que le germe est encore dans sa crypte osseuse (figure 26 : C et D). On identifie un marquage du récepteur PTHR1 au niveau du sac folliculaire qui encercle le germe (figure 26 : B1, C1, D1).

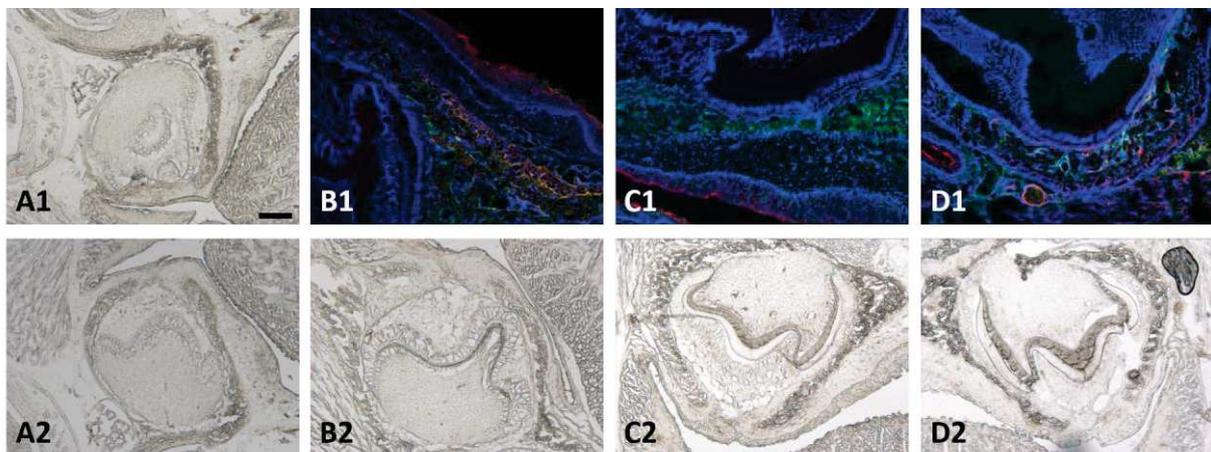


Figure 26 : Développement de la première molaire (A1, A2, B2, C2, D2) en contraste de phase et localisation de PTHR1 par immunofluorescence (B1, C1, D1, en vert et en rouge) à différents temps de vie. A1 : molaire maxillaire à PN1 ; A2 : molaire mandibulaire à PN1 ; B1, B2 : molaire mandibulaire à PN3 ; C1, C2 : molaire maxillaire à PN6 ; D1, D2 : molaire maxillaire à PN9. Barre = 200 µm pour A1, A2, B2, C2 et D2 et 100 µm pour B1, C1, D1.

En parallèle de la morphogenèse radiculaire, les processus éruptifs se mettent en place et la dent évolue progressivement jusqu'à son éruption dans la cavité buccale et sa mise en occlusion fonctionnelle. En effet, dès le 16<sup>ème</sup> jour post-natal l'épithélium oral s'ouvre en regard des cuspides de la première molaire (figures 27 B1 et 28 A1, A2). À PN20, la couronne dentaire est entièrement visible dans la cavité buccale. PTHR1 est alors localisé essentiellement au niveau de l'espace périradiculaire (figure 28 B2).

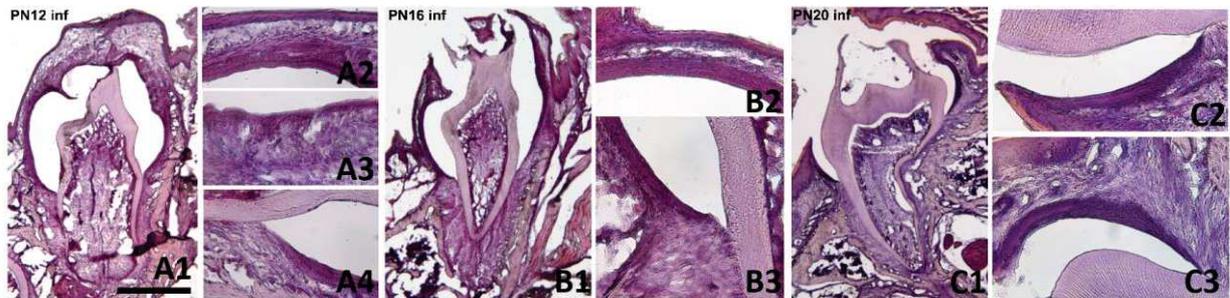


Figure 27 : Évolution de la première molaire inférieure de souris entre PN12 (A1, A2, A3, A4), PN16 (B1, B2, B3) et PN20 (C1, C2, C3) (coloration hématoxyline-éosine).  
Barre = 400  $\mu$ m pour A1, B1 et C1 et 100  $\mu$ m pour A2, A3, A4, B2, B3, C2 et C3.

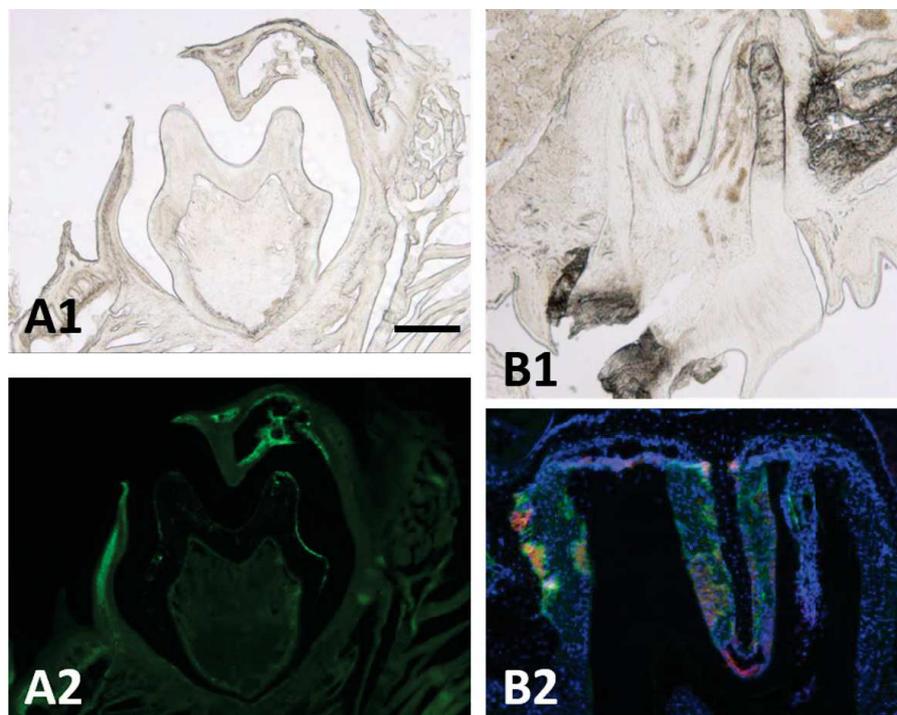


Figure 28 : Degré d'éruption de la première molaire dans la cavité buccale à PN16 (A1, A2) et à PN20 (B1, B2) et localisation de PTHR1 par immunofluorescence (A2, B2).  
Barre = 250 $\mu$ m

#### 4.4.5. Discussion

Le moment de l'éruption varie d'une dent à l'autre. Dans l'optique de mettre en œuvre des travaux sur les pathologies de l'éruption et le développement de traitements, il est indispensable de connaître précisément la cinétique de l'éruption afin de définir une fenêtre thérapeutique optimale en fonction du degré d'évolution de la dent. En effet, une prise en charge tardive de pathologies de l'éruption d'étiologie génétique comme les défauts primaires d'éruption compromet le pronostic dans la mesure où des anomalies morphologiques (angulation radiculaire) ou histologiques (ankylose) peuvent alors apparaître. Un diagnostic génétique précoce permet d'optimiser les traitements de ces patients atteints de formes isolées ou syndromiques.

L'étude préalable sur un modèle animal est donc nécessaire pour améliorer la compréhension et l'évaluation de ces fenêtres de tir thérapeutiques et du type de traitement à entreprendre. La cinétique de l'éruption dentaire peut varier légèrement d'une lignée à l'autre. Le choix des témoins pour les travaux ultérieurs sur les anomalies de l'éruption ne doit donc pas être le fruit du hasard.

#### **En résumé**

Les mécanismes physiologiques de l'éruption dentaire chez la souris se mettent en place relativement précocement au cours de la vie, de sorte que les molaires font leur éruption dans la cavité buccale au 16<sup>ème</sup> jour de vie chez les souris BALB/C de la lignée entretenue au sein de notre animalerie. Ces processus permettent des mouvements du germe dans sa crypte osseuse en parallèle de sa morphogenèse radiculaire.

#### 4.5. Bio-ingénierie dentaire et éruption : approche expérimentale avec utilisation d'une membrane de polycaprolactone en prévention de l'ankylose du germe

##### 4.5.1. Introduction

Les germes des premières molaires mandibulaires prélevés au 14<sup>ème</sup> jour de développement embryonnaire et implantés chez la souris adulte en zone diastémale ne font quasiment jamais leur éruption dans la cavité buccale, bien que la morphogenèse coronaire et radiculaire se poursuivent. La dent ainsi obtenue reste au fond de sa crypte osseuse malgré l'absence d'obstacle mécanique et n'est donc pas fonctionnelle. Des zones d'ankylose ont été mises en évidence en histologie après coloration au trichrome de Mallory. L'ankylose correspond à l'absence de ligament parodontal entre l'os alvéolaire et la surface radiculaire qui sont donc directement en contact.

##### 4.5.2. Objectif expérimental

La préservation du sac folliculaire après les étapes de mise en culture sur milieu semi-solide est un élément primordial. Il doit être manipulé le moins possible et de façon atraumatique pour éviter de le léser. L'objectif de nos travaux a été de créer une barrière mécanique entre l'os et le sac folliculaire, et ainsi contrecarrer le processus d'ankylose. Pour cela, nous avons choisi une membrane nanofibreuse synthétique de polycaprolactone (PCL) obtenue par électrospinning. Elle a l'avantage d'être biocompatible, résorbable, nanostructurée et peu encombrante.

##### 4.5.3. Matériels et méthodes

###### *Prélèvements des germes*

Les germes des premières molaires mandibulaires (M1) ont été prélevés au 14<sup>ème</sup> jour de développement embryonnaire. Pour cela les femelles gestantes ont été sacrifiées par injection intrapéritonéale de pentobarbital sodique (Doléthal® 0,025mL/10g). Les embryons ont été prélevés et décapités. Les têtes ont été placées dans du milieu de culture DMEM-F12. La mandibule est isolée et les germes prélevés par microdissection à l'aide de lames de bistouri.

### *Culture sur milieu semi-solide*

Les germes intacts ont été cultivés pendant 5 jours sur un milieu semi-solide composé de 15 mL de DMEM-F12, 0,2 mL de vitamine C (Merck, Lyon, France), 0,2 mL de glutamine (Invitrogen, Villebon sur Yvette, France), 0,2 mL d'un mélange de pénicilline et streptomycine (Invitrogen, Villebon sur Yvette, France), 4 mL de sérum de veau fœtal (FBS) et d'agar dilué dans de l'eau stérile. Le milieu était changé tous les 2 jours.

### *Synthèse de la membrane de PCL*

La polycaprolactone a été dissoute dans un mélange de dichlorométhane et de diméthylformamide (DCM/DMF 50/50). Cette solution a été électrospinnée pour produire une membrane nanofibreuse selon le protocole suivant : la solution placée dans une seringue de 5 mL a été éjectée par l'aiguille de 0,5 mm avec une pompe programmable (Harvard Apparatus) à travers un champ électrique de 15 kV. Les fibres ont été collectées sur des feuilles d'aluminium (20x20 cm).

### *Phase chirurgicale*

Les souris BALB/C proviennent de la lignée entretenue à l'animalerie centrale de la faculté de médecine de l'Université de Strasbourg. Les animaux ont été anesthésiés à l'aide d'une solution de kétamine (Virbac, Centravet, Nancy, France), de xylazine (Rompun 2%, Centravet, Nancy, France) et d'eau stérile administrée par injection intrapéritonéale (0,1 mL pour 10g de souris). Le protocole expérimental a obtenu l'autorisation du Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche sous le numéro 01716.02. Le Comité d'éthique de Strasbourg appelé « Comité Régional d'Ethique en Matière d'Expérimentation Animale de Strasbourg (CREMEAS) » a approuvé cette étude.

Les souris ont été placées en décubitus dorsal sur un dispositif opératoire spécifique permettant de maintenir l'ouverture buccale à l'aide de 4 crochets montés sur des élastiques et respectivement fixés sur les incisives supérieures, les incisives inférieures et les commissures labiales (figure 29).



Figure 29 : Installation de l'animal en décubitus dorsal. L'ouverture buccale est maintenue par des élastiques.

L'intervention a eu lieu sous binoculaire. Après incision de la muqueuse et forage d'une cavité osseuse au niveau de la zone diastémale du maxillaire à l'aide d'une fraise tungstène (500 $\mu$ m), une membrane de PCL a été placée directement au contact de l'os (n=26) (figure 30). Le germe préalablement cultivé a été implanté sur cette membrane et le site opératoire a été refermé avec de la colle utilisée pour les chirurgies parodontales (Histoacryl<sup>®</sup>, B Braun). Les souris témoins (n=30) ont bénéficié du même traitement mais seul le germe a été implanté, sans la membrane de PCL, constituant ainsi le groupe contrôle.

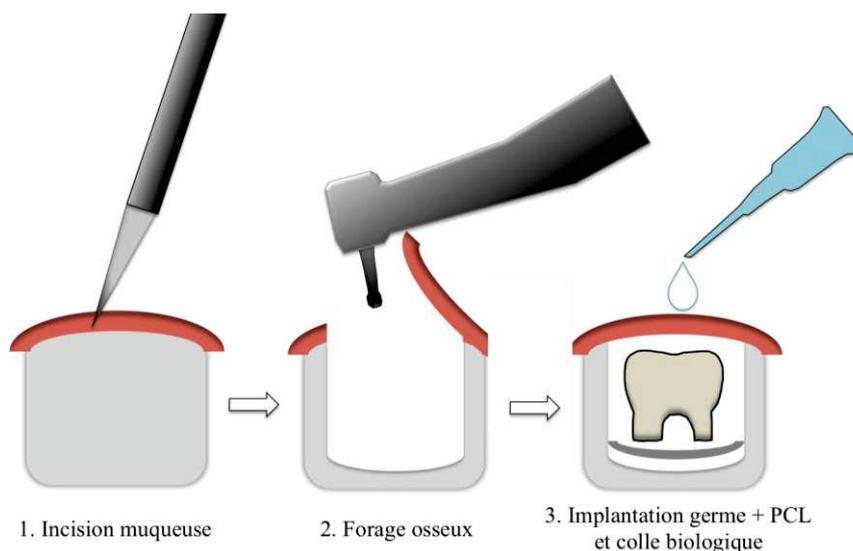


Figure 30 : Représentation schématique du protocole chirurgical d'implantation d'un germe de molaire (ED=14) associé à une membrane de polycaprolactone.

### *Récupération des échantillons*

Les animaux ont été sacrifiés à différents temps post-opératoires (entre 2 et 10 semaines) par injection intrapéritonéale de pentobarbital sodique (Doléthal®), afin d'obtenir une cinétique de l'éruption dans les différentes conditions expérimentales. Les échantillons ont été fixés dans du paraformaldéhyde (PFA) à 4% pendant une nuit puis analysés selon deux possibilités :

- les échantillons avec une dent visible (ayant franchi la barrière gingivale) ont été dans un premier temps stabilisés dans de l'agar et analysés par microtomographie haute résolution (microCT HT),
- les échantillons pour lesquels aucune dent n'était visible ont été déminéralisés et des coupes histologiques en paraffine ont été réalisées.

Les échantillons analysés en microCT HT ont ensuite été déminéralisés et traités comme ceux ne présentant pas de dent en éruption.

La déminéralisation a été réalisée selon le protocole suivant :

- rinçage à l'eau distillée 3x10 min
- immersion dans du décalcifiant LEICA® 3h à 37°C sous agitation (pH=1)
- rinçage à l'eau distillée 3x10 min
- rinçage au PBS sans calcium et sans magnésium pendant 1 nuit sous agitation, à température ambiante.

L'analyse par microCT permettait d'objectiver la morphologie de la molaire, son orientation spatiale et la présence ou non de plages d'ankylose au niveau radiculaire.

L'analyse des coupes histologiques permettait d'évaluer le nombre de dents formées, leur morphologie et leur orientation.

### *Analyse statistique*

Un test exact de Fisher a été réalisé avec un intervalle de confiance à 95% afin d'évaluer de taux de signification entre les différentes modalités.

### *Imagerie microCT*

Les acquisitions par microCT à rayons X ont été réalisées dans le département d'ingénierie biomédicale de l'Université de Bâle qui utilise le système Nanotom® m (GE Sensing & Inspection Technologies GmbH, Wunstorf, Germany). Concernant la résolution

spatiale isotropique, la taille du pixel était de 8  $\mu\text{m}$  et la taille du champ d'environ 24,6 mm  $\times$  19,2 mm. L'acquisition des données et les reconstructions volumiques ont été réalisées par l'équipe suisse qui a eu recours au logiciel Phoenix Datos x 2.0 (Phoenix X-ray, GE Sensing & Inspection Technologies GmbH, Wunstorf, Germany).

#### 4.5.4. Résultats

##### *Développement dentaire*

Sur les 56 germes implantés, 59% ont poursuivi leur développement après implantation en site osseux. Les molaires qui se sont développées présentent une morphologie correcte (figure 31), à savoir une couronne présentant plusieurs cuspides et un début d'édification radiculaire. Leur taille est restreinte : elles sont toutes plus petites que la première molaire maxillaire voisine du site d'implantation, avec une réduction de la hauteur coronaire de l'ordre de 37,5%.

Figure 31 : Coupes histologiques des germes (ED14) implantés avec une membrane de PCL (RS) ou sans membrane (LS), à 3, 4, 5, et 6 semaines post-opératoires (coloration de Mallory).

### Eruption

Au total, seulement 17,8% des échantillons présentent des dents mal orientées. Nos résultats confirment la possibilité d'orienter le germe au moment de l'implantation sous binoculaire afin d'avoir un axe optimal propice à l'éruption.

Parmi les 30 échantillons témoins, une seule dent (3,3%) à fait son éruption dans la cavité buccale. Les germes implantés avec une membrane de PCL (n=26) ont fait leur éruption dans 19,2% des cas, dès la 4<sup>ème</sup> semaine post-opératoire (figure 29). Un test exact de Fisher a été réalisé avec un intervalle de confiance à 95% :  $p=0,08$ .

Parmi les dents qui ont fait leur éruption, aucune mobilité pathologique n'a été observée (examen *ex vivo*). De plus les animaux avaient bénéficié d'une alimentation dure dès leur réveil. Des plages réduites d'ankylose (fusion entre l'os et la surface radiculaire) ont cependant pu être observées sur certaines coupes histologiques (figure 31).

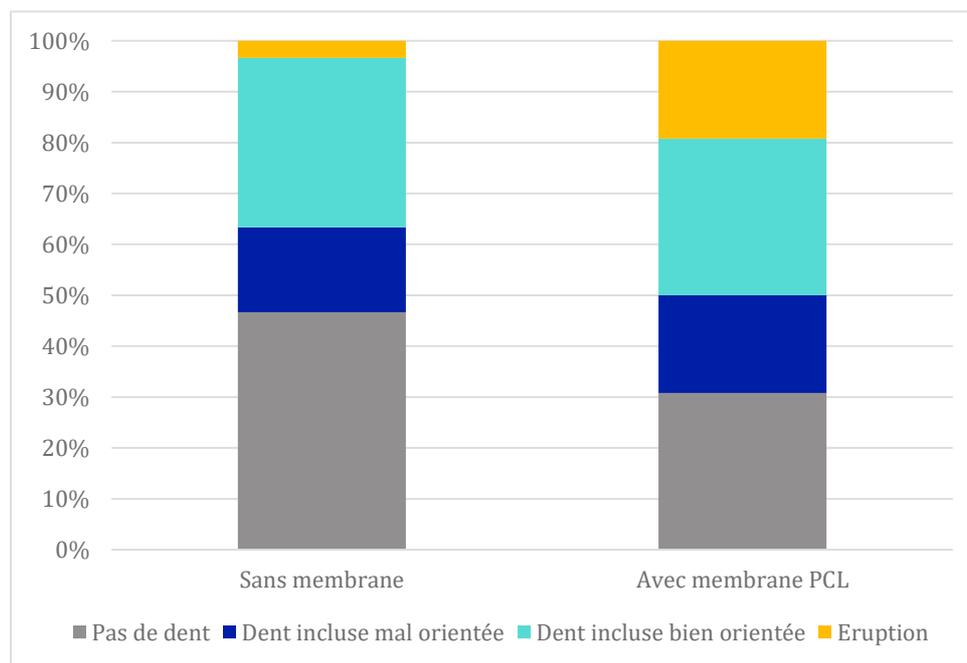


Figure 32 : Développement et éruption des germes implantés en site intra-osseux maxillaire, avec ou sans membrane nanofibreuse de polycaprolactone.

Un espace péri-dentaire est visualisable sur les coupes obtenues par imagerie microCT (figure 33A).

Figure 33 : Eruption d'une molaire implantée à l'état de germe en zone diastémale avec une membrane de PCL. Coupe frontale (A) et reconstruction volumique (B) à partir des acquisitions par micro-CT. Barre = 100  $\mu\text{m}$  pour A et B.

#### 4.5.5. Discussion

##### *Développement dentaire*

Concernant les maxillaires dans lesquels aucune dent n'a été retrouvée, deux hypothèses peuvent être évoquées : soit le germe n'a pas continué sa morphogenèse ni son développement et a fait l'objet d'un processus de résorption, soit la fermeture du site opératoire était insuffisante et le germe a été expulsé. En effet la fermeture des tissus gingivaux bord à bord est difficile à obtenir, le germe et la membrane remplissant largement la cavité osseuse créée.

Le forage osseux réalisé peut être à l'origine d'un échauffement du tissu osseux, potentiellement à l'origine de lésions et d'altérations cellulaires traumatiques modifiant le métabolisme osseux avec des zones ischémiques ou nécrotiques. Afin de limiter ce phénomène, la vitesse de rotation de la fraise a été limitée à 12 000 tours/min et le temps de forage réduit au minimum, une irrigation continue étant difficilement envisageable.

##### *Eruption*

Sur le plan histologique il n'existe pas de ligament desmodontal à proprement parler, se pose alors la question de l'évolution de ces dents à long terme. Vont-elles suivre la croissance osseuse verticale ou au contraire s'ankyloser une fois la membrane résorbée ?

Cette stratégie de transplantation d'un germe dentaire pourrait être mise en parallèle avec la technique d'auto-transplantation utilisée chez l'Homme. L'auto-transplantation dentaire est une thérapeutique largement décrite chez l'Homme et consistant en l'avulsion d'une dent non conservable et son remplacement par une autre dent ayant fait son éruption mais dont l'édification radiculaire n'est pas encore achevée [6,143]. Les principales différences avec notre approche sont les suivantes :

- la dent implantée n'est pas au même stade de développement : son édification radiculaire est achevée aux 2/3, elle est vascularisée et innervée ;
- le site receveur : dans le cas de nos travaux chez l'animal, le site receveur est une zone de l'os maxillaire dépourvue de dent, en l'absence d'os alvéolaire, semblable à ce que l'on trouve chez les patients édentés (édentement ancien ou agénésies). Tandis que l'auto-

transplantation permet l'implantation du germe dans une alvéole dentaire présentant encore des fibres desmodontales tapissant l'os alvéolaire.

Nous avons préalablement émis l'hypothèse qu'une implantation d'un germe obtenu par bioingénierie dans une alvéole vide augmenterait nos chances d'obtenir une éruption, mais le germe ne se développait pas. Une perspective serait d'évaluer la capacité du germe à se développer dans une alvéole dont le fond a été tapissé d'une membrane de PCL qui pourrait alors servir de support à la prolifération des fibroblastes, principal composant du ligament parodontal.

#### 4.5.6. Conclusion

L'implantation d'une membrane nanofibreuse de PCL entre l'os maxillaire et le germe dentaire permet d'augmenter de taux de succès relatif à l'éruption de la molaire. Cependant les échecs, principalement liés à l'ankylose du germe en développement, sont encore nombreux et la fonctionnalisation de la membrane avec des molécules d'intérêt susceptibles de stimuler l'éruption constitue une des nombreuses pistes thérapeutiques.

#### **En résumé**

La mise en place préalable d'une membrane de PCL au fond de la cavité osseuse recevant un germe dentaire prélevé chez l'embryon de souris permet à la dent de se développer et limite les phénomènes d'ankylose précoce et favorise l'éruption de la molaire dans la cavité buccale.

## 4.6. Perspectives

### 4.6.1. Utilisation d'une membrane de PCL fonctionnalisée avec la PTH pour stimuler l'éruption du germe implanté en site osseux

#### 4.6.1.1. Introduction

Une de nos perspectives de recherche consiste en la fonctionnalisation de cette barrière que constitue la membrane de PCL avec des molécules bioactives susceptibles de stimuler l'éruption de la dent implantée en site osseux. Par exemple, plusieurs auteurs ont montré que l'éruption d'une molaire était accélérée par l'injection de CSF-1. L'objectif de nos travaux est de délivrer la molécule d'intérêt *in situ* afin de limiter la dose délivrée mais aussi d'éviter un nouveau geste invasif telle qu'une injection. La membrane de PCL a donc été choisie comme support, permettant un contrôle de la diffusion locale de la molécule.

Nous avons souhaité étudier les effets potentiels de la parathormone (PTH) sur l'éruption de nos germes implantés. PTH est sécrétée par la glande parathyroïdienne et a une activité endocrine sur les tissus osseux et le rein, régulant ainsi l'homéostasie phosphocalcique. Bien que PTHrP se fixe sur le même récepteur que PTH, à savoir PTHR1, son rôle diffère dans la mesure où son activité paracrine module la différenciation et la prolifération cellulaire [17].

#### 4.6.1.2. Matériels et méthodes

##### *La membrane nanofibreuse fonctionnalisée*

La membrane de polycaprolactone obtenue par électrospinning (voir 4.5.3.) a été fonctionnalisée avec de la PTH en suivant la technique des nanoréservoirs (alternance de bains de polyanions : PTH et de polycations : chitosan).

##### *Caractérisation de la membrane fonctionnalisée par la PTH en microscopie électronique à balayage (MEB)*

Un échantillon de la membrane a été déshydraté dans des bains d'alcool successifs et de concentrations croissantes (25%, 50%, 75%, 90%, 100%) de 10 min chacun. Il a été fixé

sur un plot à l'aide d'un morceau de ruban adhésif conducteur et de l'héxaméthylsilazane (HDMS) a été déposé sur l'échantillon. L'objectif était d'observer au MEB (Inspect F, FEI, Eindhoven, Netherlands) si la membrane nanofibreuse était bien fonctionnalisée de façon homogène.

*Expérimentation animale* : caractérisation de l'effet *in vivo* sur l'éruption des germes dentaires obtenus par bioingénierie de la membrane PCL fonctionnalisée par PTH

Le protocole expérimental a obtenu l'autorisation du Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche sous le numéro 01716.02. Le Comité d'éthique de Strasbourg appelé « Comité Régional d'Ethique en Matière d'Expérimentation Animale de Strasbourg (CREMEAS) » a approuvé cette étude.

L'implantation a été réalisée comme décrit précédemment (voir 4.5.3.) et les animaux ont été sacrifiés après 8 semaines par surdose d'anesthésique (injection intrapéritonéale d'une dose de pentobarbital sodique). Les échantillons ont été fixés dans du paraformaldéhyde (PFA) à 4% pendant une nuit et traités comme décrit précédemment (voir 4.5.3.).

#### *Analyse des échantillons*

L'analyse histologique et par imagerie microCT permettra d'évaluer la présence ou non de plages d'ankylose et la proportion de dents formées mais non évoluées dans la cavité buccale. La cinétique de l'éruption sera également comparée à celle des échantillons témoins (membrane de PCL non fonctionnalisée) afin de déterminer si la libération *in situ* de PTH à partir des nanoréservoirs accélère l'éruption des molaires.

#### 4.6.1.3. Résultats préliminaires (*travaux en cours*)

##### *Caractérisation de la membrane nanofibreuse fonctionnalisée*

L'observation en microscopie électronique à balayage a mis en évidence la présence de nanoréservoirs à la surface des nanofibres de PCL (figure 34). Leur répartition et leur taille sont relativement homogènes.

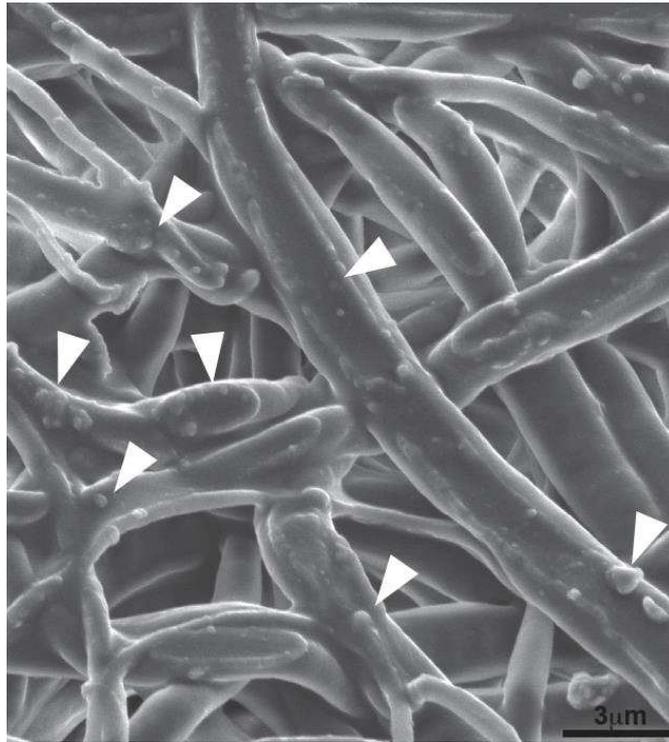


Figure 34 : Mise en évidence des nanoréservoirs de PTH après observation en microscopie électronique à balayage (têtes de flèches blanches).

## 4.6.2. Les défauts d'éruption dentaire : mise au point d'un modèle murin, étude des mécanismes biologiques impliqués et développement d'une thérapeutique

### 4.6.2.1. Introduction

#### 4.6.2.1.1. Les défauts d'éruption dentaire chez l'Homme

Chez l'Homme, les défauts primaires d'éruption (DPE) ou Primary Failure of Eruption (PFE) sont caractérisés par l'échec d'éruption des dents postérieures ou des secteurs latéro-postérieurs (molaires +/- prémolaires) en l'absence d'obstacle mécanique sur le chemin d'éruption [113]. Ces dents sont donc bien présentes mais incluses ou partiellement en désinclusion. Elles poursuivent leur morphogenèse et édification normalement mais en restant à l'intérieur de leur crypte osseuse. Les dents mandibulaires ont tendance à présenter des coudures dans le dernier tiers radiculaire (figure 35). Les dents permanentes et temporaires peuvent être affectées. Les tableaux cliniques sont variés dans leur sévérité et leurs présentations phénotypiques avec des patients présentant jusqu'à 4 quadrants atteints, des profondeurs d'inclusion plus ou moins sévères et parfois des zones de résorptions internes associées (figure 36) [128].

Figure 35 : DPE touchant plusieurs quadrants en denture permanente (selon Strub *et al.*, 2019) [128].

Figure 36 : Première molaire maxillaire incluse présentant une résorption interne étendue (selon Strub *et al.*, 2019) [128].

Des formes isolées ou syndromiques de DPE existent. Sur le plan épidémiologique, les formes isolées sont plus prévalentes et différentes mutations des parties codantes du gène *PTHR1*, codant pour le récepteur 1 de l'hormone parathyroïdienne, ont été mises en cause (tableau 1) [45]. Ce gène est localisé chez l'Homme sur le chromosome 3 en position 21.31 (figure 37).

Tableau 1 : Mutations du gène *PTHR1* à l'origine de défauts primaires d'éruption (d'après Hanisch *et al.*,2018 [45]).

Figure 37 : Localisation du gène *PTHR1* sur le chromosome 3 [38].

Leur transmission suit le plus souvent le mode autosomique dominant et la pénétrance est variable [25,118]. *PTHR1* est un récepteur transmembranaire dont les deux ligands sont l'hormone parathyroïdienne (PTH) et le peptide PTHrP (Parathyroid Hormone related Peptide). Ils sont impliqués dans les mécanismes de régulation de l'homéostasie calcique et dans le métabolisme osseux [17]. L'expression de PTHrP est augmentée au moment de la formation du chemin d'éruption intra-osseux (activité ostéoclastique). PTHrP est aussi impliqué dans le développement de l'organe dentaire [75].

Rappelons que PTH et PTHrP stimulent également l'activation de la voie RANK/RANKL [99], dont les rôles dans l'ostéoclastogenèse et les mécanismes physiologiques de l'éruption ne sont plus à démontrer.

Les conséquences locales et loco-régionales des DPE sont multiples et potentiellement sévères :

- risque carieux localement élevé
- retentissement fonctionnel se traduisant par une diminution du coefficient masticatoire
- conséquences esthétiques
- altération de la croissance osseuse des maxillaires.

En ce qui concerne la prise en charge thérapeutique de ces patients, la traction chirurgico-orthodontique visant à appliquer des forces de traction pour mettre la dent en fonction sur l'arcade aboutit souvent à l'ankylose de la dent atteinte, ce qui constitue un échec thérapeutique majeur. Sur le plan des aspects médico-économiques relatifs aux DPE, la durée des traitements et le coût sont considérables pour un taux de succès relativement faible [128].

L'échec de l'éruption malgré l'absence d'obstacle mécanique est une problématique se rapprochant de celle des germes implantés en zone diastémale, l'objectif thérapeutique étant de restaurer les processus moléculaires impliqués dans la régulation de l'éruption. Ainsi nos travaux s'orientent désormais vers la mise au point d'un modèle murin, aussi isomorphe que possible et présentant les caractéristiques phénotypiques typiques des DPE et impliquant le récepteur PTHR1. Ces travaux pourraient permettre de caractériser finement les différents aspects phénotypiques et d'étudier les potentielles cibles thérapeutiques.

#### 4.6.2.1.2. Les modèles animaux de défauts d'éruption dentaire

- Ciblage des BMP

En 2011, Wise et coll. ont montré le rôle majeur de la BMP-6 dans l'éruption dentaire chez le rat [149]. Le passage de dent à travers la gencive a lieu autour du 18<sup>ème</sup> jour et un pic d'expression de la BMP-6 est noté dans la partie basale du FD au 11<sup>ème</sup> jour de vie. Au 7<sup>ème</sup> et 11<sup>ème</sup> jours de vie, un siRNA (small interfering RNA) ciblant la BMP-6 a été injecté dans le FD de la 1<sup>ère</sup> molaire, injection suivie d'une électroporation. Ces travaux ont permis de retarder voire d'empêcher totalement l'éruption de la molaire en inhibant l'activité ostéogénique. L'activité ostéoclastique normale ayant pourtant permis la formation d'un chemin d'éruption intra-osseux, ce qui se rapproche des caractéristiques des DPE.

- Ciblage de la voie PTH-PTHrP-PPR

Les souris KO pour *PTHrP* (Parathyroid Hormone Receptor 1) ne sont pas viables [109] et les hétérozygotes ne présentent pas un phénotype de défaut d'éruption dentaire.

En 1988, Philbrick et coll. ont mis au point un modèle murin de défaut primaire d'éruption chez des souris knockout pour *PTHrP* (figure 38) [109]. L'analyse par microCT des os maxillaires a mis en évidence la continuité du tissu osseux occlusal aux molaires et aux incisives (pas de chemin d'éruption). Des ostéoclastes matures ont pourtant été identifiés suggérant une altération de la fonction ostéoclastique et non de leur différenciation. La morphologie dentaire est normale et ces dents évoluent vers un processus d'ankylose.

Figure 38 : Comparaison des crânes de souris adultes de type sauvage (A et B) et des souris knock-out *PTHrP* (C et D). Les incisives et molaires sont clairement absentes du maxillaire (comparer A et C) et de la mandibule (comparer B et D) chez ces animaux. (selon Philbrick *et al.*, 1988) [109].

Chez les souris qui présentent un déficit en PTHrP-PPR, on note une augmentation de la différenciation des cellules du FD en cémentoblastes-like avec formation précoce de ciment le long des racines et des défauts d'éruption dentaires associés [131].

- Utilisation du système Cre-LoxP

Le système Cre-LoxP du bactériophage P1 permet une recombinaison au niveau des sites LoxP situés de part et d'autre d'un gène d'intérêt [122], par exemple *PTH1*, chez des souris génétiquement altérées ( $CRE^{ERT2}/PTH1^{fl/fl}$ ) après administration de tamoxifène. Le principal avantage est de contrôler le moment de l'inactivation du gène. En effet, si les KO ne sont pas viables, il est alors envisageable d'inactiver l'expression de la protéine une fois le développement de l'animal assez avancé pour éviter l'effet létal de l'inactivation. Dans le cytoplasme, le tamoxifène agit en se fixant sur un domaine de liaison modifié du récepteur des œstrogènes présent sur la  $Cre^{ERT2}$ . Cela permet l'internalisation de la recombinase dans le noyau cellulaire et son action sur l'ADN [62]. En l'absence de tamoxifène, la Cre se trouve dans le cytoplasme et le récepteur aux œstrogènes interagit avec la protéine HSP90 (Heat Shock Orotein 90) (figure 39) [62].

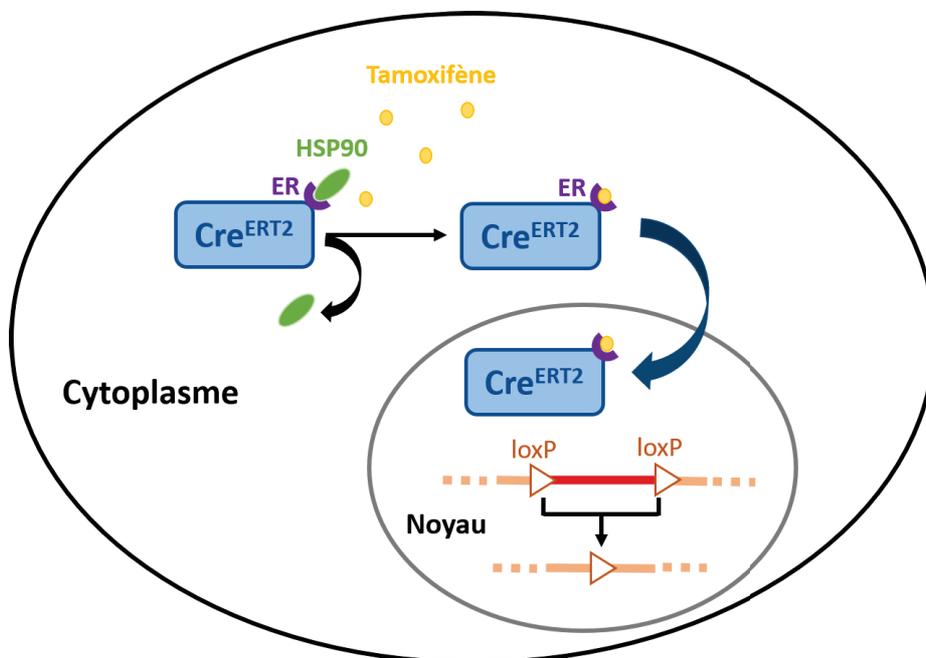


Figure 39 : Représentation schématique du système de recombinaison  $Cre^{ERT2}$ .

En 2019, Takahashi et coll. ont ainsi montré que les souris génétiquement altérées PTHrP-Cre;PPR<sup>fl/+</sup> (DF-PPR cHet) présentaient une éruption normale malgré l'administration de tamoxifène au 3<sup>ème</sup> jour post-natal (PN3) [131]. Un marquage de PPR est encore positif au niveau de la zone de furcation et le long des racines en cours d'édification. Tandis que les premières molaires des souris PTHrP-Cre;PPR<sup>fl/fl</sup> (DF-PPR cKO) n'ont pas fait éruption dans la cavité buccale au 25<sup>ème</sup> jour de vie. Une hypercémentose est observée au niveau de la surface radiculaire, mais pas au niveau de la zone de furcation. A 6 mois, 68% des premières molaires n'ont pas franchi la barrière gingivale. Les 2<sup>èmes</sup> molaires sont atteintes de façon moins sévère en ce qui concerne leur profondeur d'inclusion et les 3<sup>èmes</sup> molaires ne présentent pas d'atteinte significative. 52% des animaux présentent une forme bilatérale et 16% une forme unilatérale (figure 40). L'analyse par imagerie microCT permet d'objectiver la présence de racines dilacérées et courtes, et un os peu dense dans la zone de furcation radiculaire. L'imagerie *in vivo* permet un suivi longitudinal des animaux confirmant une éruption retardée ou inexistante [135].

Figure 40 : La suppression de PPR dans les cellules PTHrP-creER du FD reprend en partie les caractéristiques de DPE chez l'humain. (A–C) Phénotypes à 6 mois. Diagramme circulaire : incidence de l'échec de l'éruption (absence de perforation gingivale). (D) Superpositions de modèles de surface microCT 3D : superposition de DF-PPR cHet et DF-PPR cKO. La pointe de la flèche jaune indique la première molaire associée à un DPE et à des anomalies radiculaire. Cn, condyle; Cr, processus coronoïde; Go, angle gonial; In, incisive. (D' et D'') Superposition de modèle de surface 3D des premières molaires mandibulaires. Les pointes des flèches bleues indiquent une des racines courtes associée à des courbures (selon Takahashi *et al.*, 2019) [131].

#### 4.6.2.2. Matériels et méthodes (*travaux en cours*)

*L'obtention d'un financement à hauteur de 20 000 euros par la Société Française d'Orthopédie Dento-Faciale (SFODF) dans le cadre de l'appel à projet 2018 de l'interface INSERM-SFODF a permis de démarrer les expérimentations selon le protocole présenté plus bas. Une demande d'autorisation relative à l'expérimentation animale a été acceptée par le ministère de l'enseignement supérieur, de la recherche et de l'innovation (APAFIS#19550-2019022815364978).*

##### *Les animaux*

Les souris KO pour *PTHR1* n'étant pas viables [109], il est donc souhaitable d'utiliser un modèle permettant un contrôle temporel de l'inactivation de *PTHR1*. Pour cela, des souris génétiquement altérées *PTHR1*<sup>fl/+</sup> (TAAM, CNRS Orléans) ont été croisées pour obtenir des animaux *PTHR1*<sup>fl/fl</sup>. Ces animaux *PTHR1*<sup>fl/fl</sup> seront croisés avec des souris exprimant la recombinaison Cre de façon inductible par le tamoxifène (Centre Européen de Recherche en Biologie et en Médecine, IGBMC, Strasbourg).

Notre choix s'est porté sur des souris exprimant la recombinaison de façon tissu-spécifique, à savoir uniquement dans le tissu osseux : les souris Col1 $\alpha$ 1-CreERT2. La séquence codante de la Cre est alors sous la dépendance d'un promoteur spécifique des ostéoblastes : le collagène 1 $\alpha$  (Col1 $\alpha$ 1) [62]. Comme décrit précédemment, de nombreuses structures dentaires et péri-dentaires contribuent aux mécanismes biologiques de l'éruption (voir 4.2.) et *PTHR1* est exprimé notamment au niveau du tissu osseux et des tissus parodontaux. Cette approche « tissu-spécifique » d'inactivation pourrait permettre de cibler davantage le rôle clé de *PTHR1* dans les mécanismes de l'éruption *via* une régulation spatio-temporelle de son expression.

##### *Induction par administration de tamoxifène*

Le tamoxifène (0,25mg ; T5648; Sigma-Aldrich) sera dilué dans l'huile de maïs (S5007; Sigma-Aldrich) et sera administré par gavage à l'aide d'une canule gastrique ou par injection intrapéritonéale au 3<sup>ème</sup> jour de vie. Ce choix est justifié par les âges d'éruption dentaire (éruption des molaires au 16<sup>ème</sup> jour post-natal) et donc des mouvements pré-éruptifs qui démarrent avant même la naissance. Les quantités administrées seront de

1mg/20g de souris. A raison d'une dilution du tamoxifène à hauteur de 10 mg par mL de solution, le volume administré sera de 100 microlitres par animal et par prise. Les sondes utilisées seront des sondes de gavage en polypropylène de 22 gauges, les tubes flexibles étant recommandés car ils apportent à l'animal un bien-être par rapport aux traditionnels tubes métalliques rigides. L'extrémité molle et arrondie est conçue pour réduire les risques d'une perforation de l'œsophage). Des gavages avec de d'huile de maïs (mêmes volumes et fréquences) chez des souris permettront d'avoir des témoins.

### *Témoins*

Les souris témoins utilisées seront les suivantes :

- des souris avec le même fond génétique que les souris *PTHR1*<sup>(fl/fl)</sup> c'est à dire des C57/BL6, avec et sans administration de tamoxifène
- des souris *Cre-ER<sup>T2</sup> PTHR1*<sup>(fl/+)</sup>, avec et sans administration de tamoxifène
- des souris *Cre-ER<sup>T2</sup> PTHR1*<sup>(fl/fl)</sup>, sans administration de tamoxifène.

L'huile de tournesol sera utilisée comme témoin chez les souris « sans tamoxifène » à des volumes et des temps similaires.

### *Critères d'évaluation*

Les critères de validation du modèle seront :

- pas d'éruption des molaires au 20<sup>ème</sup> jour post-natal,
- pas d'ankylose au 20<sup>ème</sup> jour post-natal (analyse pas micro-CT haute résolution et coupes histologiques).

La validation du modèle passera par l'analyse des caractéristiques phénotypiques et radiologiques suivantes :

- molaires n'ayant pas fait leur éruption au-delà de l'âge normal d'éruption (16<sup>ème</sup> jour) (analyse histologique)
- développement coronaire et radiculaire normal (analyse histologique et immunohistochimique)
- espace desmodontal préservé (objectivable par imagerie micro-CT).

La description sera complétée par l'étude des mécanismes physiopathologiques et des voies de signalisation impliquées, notamment PTH/PTHrP/PTHR1, RANK/RANK-L et OPG. Pour cela nous utiliserons les techniques de RTqPCR et d'immunohistochimie sur coupes congelées.

La réponse à la traction orthodontique fera également l'objet d'une évaluation par la mise en place d'un dispositif de traction intra-oral à ancrage dentaire et/ou osseux, approche innovante encore jamais décrite dans la littérature pour ces modèles de défauts d'éruption chez la souris. Les premiers dispositifs de traction ont été mis au point et mis en place *ex vivo*, en collaboration avec des spécialistes qualifiés en orthopédie dento-faciale. Un ancrage antérieur est réalisé à l'aide d'un fil orthodontique cerclant les deux incisives maxillaires (figure 41). Ce système est relié à un fil de suture (Vicryl 6-0, Ethicon®, USA) dont la partie postérieure est collée sur la 1<sup>ère</sup> molaire à l'aide d'une résine composite fluide. Un système alternatif, à ancrage osseux, est également envisagé *via* l'utilisation d'un mini-implant métallique au niveau du palais osseux.

Figure 41 : Dispositif de traction orthodontique ancré sur les incisives (in) maxillaires en antérieur et sur la première molaire maxillaire (m1) en postérieur.

A = vue occlusale, B= vue latérale.

Afin de limiter la douleur pendant l'intervention, les souris seront placées sous anesthésie générale par injection intra-péritonéale d'un mélange de kétamine/xylazine (20% kétamine, 0,1% xylazine à 2% dans de l'eau stérile). Le volume de solution anesthésique injecté est de 10 microlitres/g de souris, soit 100 mg/kg de kétamine et 10 mg/kg de xylazine. Une anesthésie locale (par exemple lidocaïne à 7mg/kg) sera mise en place et relayée par l'analgésique post-opératoire de manière effective et non éventuelle. Les souris seront placées sur un champ opératoire préalablement désinfecté et équipé d'un dispositif permettant de maintenir la bouche ouverte. L'intervention comprendra les étapes suivantes:

- incision gingivale,
- décollement de la gencive et fraisage de l'os maxillaire pour accéder à la dent incluse
- collage d'un dispositif de traction au niveau des molaires incluses,
- fixation du dispositif de traction sur un appui dentaire ou osseux pouvant comprendre la mise en place d'un implant,
- fermeture avec de la colle biologique (colle cutanée Klinibond, Klinion France) afin de protéger le site opératoire, d'assurer une cicatrisation optimale et de limiter les douleurs post-opératoires.

L'analgésie post-opératoire sera assurée par l'administration de meloxicam (2 mg/kg) pendant 2 jours. Le meloxicam à usage vétérinaire existe sous forme injectable ou en suspension orale. L'administration *per os* est plus aisée dans la mesure où la solution est appétente.

L'appareillage est encombrant mais interfère peu avec l'occlusion, limitant ainsi les risques de décollement. Le protocole permettant de déterminer les forces de traction biologiquement adéquates sans léser le parodonte sera mis au moins prochainement. Le suivi des éventuels mouvements intra-osseux du germe dentaire se fera grâce à l'imagerie micro-CT *in vivo* (suivi longitudinal).

Le dispositif de traction sera mis en place pour une durée maximum de 3 mois. Si aucun mouvement dentaire n'est obtenu à 3 mois, nous considérerons que l'approche chirurgico-orthodontique abouti à un échec thérapeutique majeur.

---

## Conclusions

---

Les dents peuvent être absentes pour des raisons carieuses, infectieuses, traumatiques, liées aux séquelles de traitements chirurgicaux ou médicamenteux ou encore absentes de façon congénitale. A l'heure actuelle, le remplacement d'une ou plusieurs dents absentes s'appuie sur l'utilisation d'artifices prothétiques et sur les thérapeutiques implantaires. Cependant, les matériaux utilisés en clinique ont la particularité de ne pas être sensibles aux stimuli externes comme la température, les contraintes mécaniques ou les stimuli nociceptifs. Pourtant cette sensibilité participe à la proprioception lors de la mastication et à la protection de l'organe dentaire : par exemple les stimulus douloureux liés à une lésion carieuse de sévérité modérée constitueront un signal d'alerte pour le patient. La pulpe est un tissu conjonctif richement innervé, essentiellement par des fibres nerveuses sensibles issues du nerf trijumeau. Les vaisseaux sanguins constituent quant à eux environ 15% de la pulpe et sont indispensables à l'homéostasie tissulaire.

La spécificité de la régénération dentaire réside donc dans l'hétérogénéité des tissus (émail, dentine, pulpe) et ses interactions avec l'environnement au moment du développement, de l'éruption et de la mise en fonction de la dent.

Les travaux de l'UMR 1260 dans le domaine de l'ingénierie tissulaire dentaire sont basés sur l'utilisation de germes dentaires des premières molaires prélevés au stade capuchon chez l'embryon de souris et cultivés sur un milieu semi-solide spécifique. L'épithélium et les cellules mésenchymateuses peuvent être dissociés et les cellules mésenchymateuses associées à des cellules souches de la moelle osseuse. Ce mélange de cellules mésenchymateuses et de cellules souches cultivé avec l'épithélium dentaire compétent a permis d'obtenir un germe dentaire. Ce germe a ensuite été implanté sous la peau avec un ganglion trigéminal. Nous avons montré que les cellules souches issues de la moelle osseuse ne participent pas à l'édification de l'organe dentaire mais jouent un rôle dans le développement de fibres nerveuses périphériques au sein de la chambre pulpaire.

Nous avons poursuivi nos travaux en implantant les germes prélevés chez l'embryon en sites intra-osseux maxillaires, ce qui nous a permis d'obtenir une molaire vascularisée et innervée quand elle est associée à une source de fibres nerveuses comme un ganglion trigéminal et à l'administration de ciclosporine A. Nous avons montré qu'il était possible de délivrer localement les molécules d'intérêt telles que la ciclosporine A afin de diminuer

les doses administrées de façon systémique et de permettre une libération active de la substance. Pour cela les membranes polymériques de PCL biocompatibles et biodégradables produites par électrospinning ont été fonctionnalisées par la technique des nanoréservoirs. Ces membranes sont constituées de polycaprolactone et n'entravent pas le développement du germe et pourraient au contraire permettre de limiter les phénomènes d'ankylose que nous avons pu observer.

Le rôle des tissus environnants et en particulier du tissu osseux est primordial dans la régulation des processus d'éruption qui permettent à la dent de faire son éruption et donc d'assurer sa fonction dans la cavité buccale. Nous avons dans un premier temps mis en évidence les capacités de régénération du tissu osseux au niveau maxillaire par la mise en place de membranes de polycaprolactone dans des lésions osseuses créées chirurgicalement. Les membranes fonctionnalisées avec des nanoréservoirs de BMP-2 ont montré leur supériorité en ce qui concerne la fermeture de lésions osseuses sur des temps de cicatrisation allant jusqu'à 90 jours. La régénération d'un site osseux propice au développement du germe dentaire implanté dans un second temps est essentiel.

Les perspectives de recherche sont nombreuses, tant pour stimuler l'innervation de la dent en ayant recours à différentes molécules d'intérêt que pour favoriser l'éruption de la dent dans la cavité buccale. L'utilisation de modèles animaux de maladies rares pourrait permettre de mieux comprendre les mécanismes biologiques, mais également physiopathologiques impliqués notamment dans les processus d'éruption dentaire et les DPE et ainsi développer de nouvelles approches thérapeutiques, l'objectif étant de pouvoir transposer ces résultats chez l'Homme afin de restaurer un organe dentaire vascularisé, innervé et fonctionnel dans un environnement osseux adéquat.

---

## Références

---

- [1] Ahmadian E, Eftekhari A, Dizaj SM, Sharifi S, Mokhtarpour M, Nasibova AN, Khalilov R, Samiei M. The effect of hyaluronic acid hydrogels on dental pulp stem cells behavior. *Int J Biol Macromol*. 2019 Nov 1;140:245-254
- [2] Ahmed GM, Abouauf EA, AbuBakr N, Dörfer CE, El-Sayed KF. Tissue Engineering Approaches for Enamel, Dentin, and Pulp Regeneration: An Update. *Stem Cells Int*. 2020 Feb 25;2020:5734539.
- [3] Al Rezk F, Trimpou G, Lauer HC, Weigl P, Krockow N. Response of soft tissue to different abutment materials with different surface topographies: a review of the literature. *Gen Dent*. 2018 Jan-Feb;66(1):18-25.
- [4] Alkhamrah BA, Hoshino N, Kawano Y, Harada F, Hanada K, Maeda T. The periodontal Ruffini endings in brain derived neurotrophic factor (BDNF) deficient mice. *Arch Histol Cytol*. 2003 Mar;66(1):73-81.
- [5] Almeida LDF, Babo PS, Silva CR, Rodrigues MT, Hebling J, Reis RL, Gomes ME. Hyaluronic acid hydrogels incorporating platelet lysate enhance human pulp cell proliferation and differentiation. *J Mater Sci Mater Med*. 2018 Jun 14;29(6):88.
- [6] Asif AJ, Noorani YT, Alam K M. Tooth Auto-transplantation: An Alternative Treatment. *Bull Tokyo Dent Coll*. 2017;58(1):41-48.
- [7] Bastepe M, Turan S, He Q. G Proteins in The Control of Parathyroid Hormone Actions. *J Mol Endocrinol*. 2017 May; 58(4): R203–R224.
- [8] Beachley V, Wen X. Polymer nanofibrous structures: fabrication, biofunctionalization, and cell interactions. *Prog Polym Sci*. 2010; 35(7): 868-892.
- [9] Bornert F, Choquet P, Gros CI, Aubertin G, Perrin-Schmitt F, Clauss F, Lesot H, Constantinesco A, Schmittbuhl M. Subtle Morphological Changes in the Mandible of Tabby Mice Revealed by Micro-CT Imaging and Elliptical Fourier Quantification. *Front Physiol*. 2011 Apr 20;2:15.
- [10] Bsoul S, Terezhalmay G, Abboud H, Woodruff K, Abboud SL. PDGF BB and bFGF stimulate DNA synthesis and upregulate CSF-1 and MCP-1 gene expression in dental follicle cells. *Arch Oral Biol*. 2003 Jun;48(6):459-65.
- [11] Cahill DR, Marks SC. Tooth eruption: evidence for the central role of the dental follicle. *J Oral Pathol*. 1980;9:189–200.
- [12] Cai X, Ten Hoopen S, Zhang W, Yi C, Yang W, Yang F, Jansen JA, Walboomers XF, Yelick PC. Influence of highly porous electrospun PLGA/PCL/nHA fibrous scaffolds on the differentiation of tooth bud cells in vitro. *J Biomed Mater Res A*. 2017;105(9):2597-2607.
- [13] Casale M, Moffa A, Vella P, Sabatino L, Capuano F, Salvinelli B, Lopez MA, Carinci F, Salvinelli F. Hyaluronic acid: Perspectives in dentistry. A systematic review. *Int J Immunopathol Pharmacol*. 2016;29(4):572-582.

- [14] Chai Y, Jiang X, Ito Y, Bringas P Jr, Han J, Rowitch DH, Soriano P, McMahon AP, Sucov HM. Fate of the mammalian cranial neural crest during tooth and mandibular morphogenesis. *Development*. 2000;127(8):1671-9.
- [15] Chandrhasa S, Murray PE, Namerow KN. Proliferation of mature ex vivo human dental pulp using tissue engineering scaffolds. *J Endod*. 2011;37(9):1236-9.
- [16] Charles C, Pantalacci S, Peterkova R, Tafforeau P, Laudet V, Viriot L. Effect of eda loss of function on upper jugal tooth morphology. *Anat Rec (Hoboken)*. 2009;292(2):299-308.
- [17] Cheloha RW, Gellman SH, Vilaradaga JP, Gardella TJ. PTH receptor-1 signalling—mechanistic insights and therapeutic prospects. *Nat Rev Endocrinol*. 2015; 11(12): 712–724
- [18] Chen X, Zhang T, Shi J, Xu P, Gu Z, Sandham A, Yang L, Ye Q. Notch1 signaling regulates the proliferation and self-renewal of human dental follicle cells by modulating the G1/S phase transition and telomerase activity. *PLoS One*. 2013;8(7):e69967.
- [19] Chisini LA, Conde MCM, Grazioli G, Martin ASS, Carvalho RV, Sartori LRM, Demarco FF. Bone, Periodontal and Dental Pulp Regeneration in Dentistry: A Systematic Scoping Review. *Braz Dent J*. 2019;30(2):77-95.
- [20] Cielinski MJ, Jolie M, Wise GE, Marks SC Jr. The contrasting effects of colony-stimulating factor-1 and epidermal growth factor on tooth eruption in the rat. *Connect Tissue Res*. 1995;32(1-4):165-9.
- [21] Clauss F, Chassaing N, Smahi A, Vincent MC, Calvas P, Molla M, Lesot H, Alembik Y, Hadj-Rabia S, Bodemer C, Manière MC, Schmittbuhl. X-linked and autosomal recessive Hypohidrotic Ectodermal Dysplasia: genotypic-dental phenotypic findings. *M.Clin Genet*. 2010;78(3):257-66.
- [22] Cotton WR, Gaines JF. Unerupted dentition secondary to congenital osteopetrosis in the Osborne-Mendel rat. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1974;146:554–561.
- [23] Couvineau A, Wouters V, Bertrand G, Rouyer C, Gérard B, Boon LM, Grandchamp B, Vikkula M, Silve C. PTHR1 mutations associated with Ollier disease result in receptor loss of function. *Hum Mol Genet*. 2008; 17(18): 2766–2775.
- [24] Daltoé FP, Mendonça PP, Mantesso A, Deboni MC. Can SHED or DPSCs be used to repair/regenerate non-dental tissues? A systematic review of in vivo studies. *Braz Oral Res*. 2014;28
- [25] Decker E, Stellzig-Eisenhauer A, Fiebig BS, Rau C, Kress W, Saar K, Rüschenhoff F, Hubner N, Grimm T, Weber BH. PTHR1 loss-of-function mutations in familial, nonsyndromic primary failure of tooth eruption. *Am J Hum Genet*. 2008;83(6):781-6.
- [26] Dobbenga S, Fratila-Apachitei LE, Zadpoor AA. Nanopattern-induced osteogenic differentiation of stem cells - A systematic review. *Acta Biomater*. 2016;46:3-14.

- [27] Ducret M, Montembault A, Josse J, Padeloup M, Celle A, Benchrih R, Mallein-Gerin F, Alliot-Licht B, David L, Farges JC. Design and characterization of a chitosan-enriched fibrin hydrogel for human dental pulp regeneration. *Dent Mater*. 2019;35(4):523-533.
- [28] Eap S, Bécavin T, Keller L, Kökten T, Fioretti F, Weickert JL, Deveaux E, Benkirane-Jessel N, Kuchler-Bopp S. Nanofibers implant functionalized by neural growth factor as a strategy to innervate a bioengineered tooth. *Advanced Healthcare Material*. 2014; 3(3): 386-391.
- [29] El Bialy I, Jiskoot W., Reza Nejadnik M. Formulation, delivery and stability of bone morphogenetic proteins for effective bone regeneration. *Pharmaceutical Research*. 2017;34(6):1152-1170.
- [30] Farano V, Maurin JC, Attik N, Jackson P, Grosogeat B, Gritsch K. Sol-gel bioglasses in dental and periodontal regeneration: A systematic review. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2019;107(4):1210-1227.
- [31] Ferrand A, Eap S, Richert L, Lemoine S, Kalaskar D, Demoustier-Champagne S, Atmani H, Mély Y, Fioretti F, Schlatter G, Kuhn L, Ladam G, Benkirane-Jessel N. Osteogenic properties of electrospun nanofibrous PCL scaffolds equipped with chitosan-based nanoreservoirs of growth factors. *Macromol Biosci*. 2014;14(1):45-55.
- [32] Fibbe WE, Nauta AJ, Roelofs H. Modulation of immune responses by mesenchymal stem cells. *Ann N Y Acad Sci*. 2007;1106:272-8.
- [33] Filardo G, Perdisa F, Gelinsky M, Despang F, Fini M, Marcacci M, Parrilli AP, Roffi A, Salamanna F, Sartori M, Schütz K, Kon E. Novel alginate biphasic scaffold for osteochondral regeneration: an in vivo evaluation in rabbit and sheep models. *J Mater Sci Mater Med*. 2018;29(6):74.
- [34] Forrester JV, Wilkinson PC. Inhibition of leukocyte locomotion by hyaluronic acid. *J Cell Sci*. 1981;48:315-31.
- [35] García JR, Clark AY, García AJ. Integrin-specific hydrogels functionalized with VEGF for vascularization and bone regeneration of critical-size bone defects. *J Biomed Mater Res A*. 2016;104(4):889-900.
- [36] Garreta E, Genove E, Borros S, Semino CE. Osteogenic differentiation of mouse embryonic stem cells and mouse embryonic fibroblasts in a three-dimensional self-assembling peptide scaffold. *Tissue Eng*. 2006;12:2215-2227.
- [37] Gebhardt M, Murray PE, Namerow KN, Kuttler S, Garcia-Godoy F. Cell survival within pulp and periodontal constructs. *J Endod*. 2009;35(1):63-6.
- [38] Genome Decoration Page/NCBI. <https://ghr.nlm.nih.gov/gene/PTH1R#location>. Consulté le 20.07.2020.
- [39] Goldberg M. Histologie du complexe dentinopulpaire. *EMC - Chirurgie orale et maxillo-faciale* 2008:1-34.

- [40] Ghosal K, Chandra A, Praveen G., Snigdha S., Roy S, Agatemor C, Thomas S, Provaznik I. Electrospinning over Solvent Casting: Tuning of Mechanical Properties of Membranes Sci Rep. 2018; 8: 5058.
- [41] Grier RL, Wise GE. Inhibition of tooth eruption in the rat by a bisphosphonate. J Dent Res. 1998;77(1):8-15.
- [42] Grier RL, Zhao L, Adams CE, Wise GE. Secretion of CSF-1 and its inhibition in rat dental follicle cells: implications for tooth eruption. Eur J Oral Sci. 1998;106(3):808-15.
- [43] Gronthos S, Mankani M, Brahim J, Robey PG, Shi S. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. Proc Natl Acad Sci U S A. 2000;97(25):13625-30.
- [44] Han J, Kim DS, Jang H, Kim HR, Kang HW. Bioprinting of three-dimensional dentin-pulp complex with local differentiation of human dental pulp stem cells. J Tissue Eng. 2019;10:2041731419845849
- [45] Hanisch M, Hanisch L, Kleinheinz J, Jung S. Primary failure of eruption (PFE): a systematic review. Head Face Med. 2018;14(1):5.
- [46] Hashemi-Beni B, Khoroushi M, Foroughi MR, Karbasi S, Khademi AA. Tissue engineering: Dentin - pulp complex regeneration approaches (A review). Tissue Cell. 2017;49(5):552-564.
- [47] Hayashi M, Nakashima T, Taniguchi M, Kodama T, Kumanogoh A, Takayanagi H. Osteoprotection by semaphorin 3A. Nature. 2012;485(7396):69-74.
- [48] He L, Lin Y, Hu X, Zhang Y, Wu H. A comparative study of platelet-rich fibrin (PRF) and platelet-rich plasma (PRP) on the effect of proliferation and differentiation of rat osteoblasts in vitro. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2009;108(5):707-13.
- [49] Heinrich J, Bsoul S, Barnes J, Woodruff K, Abboud S. CSF-1, RANKL and OPG regulate osteoclastogenesis during murine tooth eruption. Arch Oral Biol. 2005;50(10):897-908.
- [50] Hu K, Olsen BR. The roles of vascular endothelial growth factor in bone repair and regeneration. Bone. 2016; 91: 30-8.
- [51] Hu L, Liu Y, Wang S. Stem cell-based tooth and periodontal regeneration. Oral Dis. 2018;24(5):696-705.
- [52] Iizuka T, Cielinski M, Aukerman SL, Marks SC Jr. The effects of colony-stimulating factor-1 on tooth eruption in the toothless (osteopetrotic) rat in relation to the critical periods for bone resorption during tooth eruption. Arch Oral Biol. 1992;37(8):629-36.
- [53] Ikeda E, Ogawa M, Takeo M, Tsuji T. Functional ectodermal organ regeneration as the next generation of organ replacement therapy. Open Biol. 2019;9(3):190010.

- [54] Inuyama Y, Kitamura C, Nishihara T, Morotomi T, Nagayoshi M, Tabata Y, Matsuo K, Chen KK, Terashita M. Effects of hyaluronic acid sponge as a scaffold on odontoblastic cell line and amputated dental pulp. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2010;92(1):120-8.
- [55] Janebodini K, Horst OV, Ieronimakis N, Balasundaram G, Reesukumal K, Pratumvinit B, Reyes M. Isolation and characterization of neural crest-derived stem cells from dental pulp of neonatal mice. *PLoS One*. 2011;6(11):e27526.
- [56] Jazayeri HE, Lee SM, Kuhn L, Fahimipour F, Tahriri M, Tayebi L. Polymeric scaffolds for dental pulp tissue engineering: A review. *Dent Mater*. 2020;36(2):e47-e58.
- [57] Jiang J, Fan CY, Zeng BF. Experimental construction of BMP2 and VEGF Gene modified tissue engineering bone in vitro. *Int J Mol Sci*. 2011;12:1744–1755.
- [58] Jung S, Meyer F. Immune cells: sources, properties, and cell types. 10.1016/B978-0-08-102906-0.00009-X. 2020
- [59] Kanafi MM, Ramesh A, Gupta PK, Bhonde RR. Dental pulp stem cells immobilized in alginate microspheres for applications in bone tissue engineering. *Int Endod J*. 2014;47(7):687-97.
- [60] Kargozar S, Baino F, Hamzehlou S, Hill RG, Mozafari M. Bioactive glasses: Sprouting angiogenesis in tissue engineering. *Trends Bio-technol* 2018;36:430–444.
- [61] Kettunen P, Løes S, Furmanek T, Fjeld K, Kvinnsland IH, Behar O, Yagi T, Fujisawa H, Vainio S, Taniguchi M, Luukko K. Coordination of trigeminal axon navigation and patterning with tooth organ formation: epithelial-mesenchymal interactions, and epithelial Wnt4 and Tgfbeta1 regulate semaphorin 3a expression in the dental mesenchyme. *Development*. 2005;132(2):323-34.
- [62] Kim H, Kim M, Im SK, Fang S. Mouse Cre-LoxP system: general principles to determine tissue-specific roles of target genes. *Lab Anim Res*. 2018;34(4):147-159.
- [63] Kim JJ, Bae WJ, Kim JM, Kim JJ, Lee EJ, Kim HW, Kim EC. Mineralized polycaprolactone nanofibrous matrix for odontogenesis of human dental pulp cells. *J Biomater Appl*. 2014;28(7):1069-78.
- [64] Kim K, Lee CH, Kim BK, Mao JJ. Anatomically shaped tooth and periodontal regeneration by cell homing. *J Dent Res*. 2010;89(8):842-7.
- [65] Kökten T, Bécavin T, Keller L, Weickert JL, Kuchler-Bopp S, Lesot H. Immunomodulation stimulates the innervation of engineered tooth organ. *PLoS One*. 2014;9(1):e86011.
- [66] Kristenová-Cermáková P, Peterka M, Lisi S, Lesot H, Peterková R. Postnatal lower jaw dentition in different phenotypes of tabby mice. *Connect Tissue Res*. 2002;43(2-3):283-8
- [67] Kuchler-Bopp S, Bécavin T, Kökten T, Weickert JL, Keller L, Lesot H, Deveaux E, Benkirane-Jessel N. Three-dimensional Micro-culture System for Tooth Tissue

Engineering. *J Dent Res*. 2016;95(6):657-64.

[68] Kuchler-Bopp S, Larrea A, Petry L, Idoux-Gillet Y, Sebastian V, Ferrandon A, Schwinté P, Arruebo M, Benkirane-Jessel N. Promoting bioengineered tooth innervation using nanostructured and hybrid scaffolds. *Acta Biomater*. 2017;50:493-501.

[69] Leijon S.C.M., Chaudhari N., Roper S.D. Mouse Trigeminal Neurons Respond to Kokumi Substances. In: Nishimura T., Kuroda M. (eds) *Koku in Food Science and Physiology*. Springer, Singapore. 2019

[70] Lesot H, Clauss F, Manière MC, Schmittbuhl M. Consequences of X-linked hypohidrotic ectodermal dysplasia for the human jaw bone. *Front Oral Biol*. 2009;13:93-99.

[71] Li J, Parada C, Chai Y. Cellular and molecular mechanisms of tooth root development. *Development*. 2017;144(3):374-384.

[72] Li J, Zhang F, Zhang N, Geng X, Meng C, Wang X, Yang Y. Osteogenic capacity and cytotherapeutic potential of periodontal ligament cells for periodontal regeneration in vitro and in vivo. *PeerJ*. 2019;7:e6589.

[73] Liu H, Yan X, Pandya M, Luan X, Diekwisch TG. Daughters of the Enamel Organ: Development, Fate, and Function of the Stratum Intermedium, Stellate Reticulum, and Outer Enamel Epithelium. *Stem Cells Dev*. 2016;25(20):1580-1590.

[74] Liu J, Ruan J, Weir MD, Ren K, Schneider A, Wang P, Oates TW, Chang X, Xu HHK. Periodontal Bone-Ligament-Cementum Regeneration via Scaffolds and Stem Cells. *Cells*. 2019;8(6).

[75] Liu JG, Tabata MJ, Yamashita K, Matsumura T, Iwamoto M, Kurisu K. Developmental role of PTHrP in murine molars. *Eur J Oral Sci*. 1998;106 Suppl 1:143-6.

[76] Louryan S, Biermans J, Flemal F. Nerve growth factor in the developing craniofacial region of the mouse embryo. *Eur J Morphol*. 1995;33(5):415-9.

[77] Louvrier A, Euvrard E, Nicod L, Rolin G, Gindraux F, Pazart L, Houdayer C, Risold PY, Meyer F, Meyer C. Odontoblastic differentiation of dental pulp stem cells from healthy and carious teeth on an original PCL-based 3D scaffold. *Int Endod J*. 2018;51 Suppl 4:e252-e263.

[78] Lungová V, Radlanski RJ, Tucker AS, Renz H, Míšek I, Matalová E. Tooth-bone morphogenesis during postnatal stages of mouse first molar development. *J Anat*. 2011;218(6):699-716.

[79] Luukko K, Kettunen P. Coordination of tooth morphogenesis and neuronal development through tissue interactions: lessons from mouse models *Exp Cell Res*. 2014;325(2):72-7.

- [80] Lungová V, Radlanski RJ, Tucker AS, Renz H, Míšek I, Matalová E. Tooth-bone morphogenesis during postnatal stages of mouse first molar development. *J Anat.* 2011;218(6):699–716.
- [81] Luzio A, Canesi EV, Bertarelli C, Caironi M. Electrospun Polymer Fibers for Electronic Applications. *Materials (Basel).* 2014;7(2):906-947.
- [82] MacLeod RS, Cawley KM, Gubrij I, Nookaew I, Onal M, O'Brien CA. Effective CRISPR interference of an endogenous gene via a single transgene in mice. *Sci Rep.* 2019;9(1):17312.
- [83] Maeda H, Tomokiyo A, Fujii S, Wada N, Akamine A. Promise of periodontal ligament stem cells in regeneration of periodontium. *Stem Cell Res Ther.* 2011;2(4):33.
- [84] Marks SC Jr, Schroeder HE. Tooth eruption: theories and facts. *Anat Rec.* 1996; 245(2):374-93.
- [85] Martinez Saez D, Sasaki RT, Neves AD, da Silva MC. Stem Cells from Human Exfoliated Deciduous Teeth: A Growing Literature. *Cells Tissues Organs.* 2016;202(5-6):269-280
- [86] Maurin JC, Couble ML, Thivichon-Prince B, Magloire H. Odontoblast: a key cell involved in the perception of dentinal pain. *Med Sci (Paris).* 2013;29(3):293-9.
- [87] Mendoza-Palomares C, Ferrand A, Facca S, Fioretti F, Ladam G, Kuchler-Bopp S, Regnier T, Mainard D, Benkirane-Jessel N. Smart hybrid materials equipped by nanoreservoirs of therapeutics. *ACS Nano.* 2012;6(1):483-90.
- [88] Michon F. The dental epithelial stem cells expressing Sox2 are involved in murine incisor renewal. *Med Sci (Paris)* 2013; 29: 341–342.
- [89] Mihatsch MJ, Kyo M, Morozumi K, Yamaguchi Y, Nickeleit V, Ryffel B. The side-effects of ciclosporine-A and tacrolimus. *Clin Nephrol.* 1998;49(6):356-63.
- [90] Mitsiadis TA, Dicou E, Joffre A, Magloire H. Immunohistochemical Localization of Nerve Growth Factor (NGF) and NGF Receptor (NGF-R) in the Developing First Molar Tooth of the Rat. *Differentiation.* 1992;49(1):47-61.
- [91] Mohamed SS, Atkinson ME. A histological study of the innervation of developing mouse teeth. *J Anat.* 1983;136(Pt 4):735–749.
- [92] Moisenovich MM, Arkhipova AY, Orlova AA, Drutskaya MS, Volkova SV, Zacharov SE, Agapov II, Kirpichnikov MP. Composite Scaffolds Containing Silk Fibroin, Gelatin, and Hydroxyapatite for Bone Tissue Regeneration and 3D Cell Culturing. *Acta Naturae.* 2014; 6(1): 96–101.
- [93] Monteiro N, Yelick PC. Advances and perspectives in tooth tissue engineering. *J Tissue Eng Regen Med.* 2017;11(9):2443-2461.
- [94] Murphy MB, Blashki D, Buchanan RM, Fan D, De Rosa E, Shah RN, Stupp SI, Weiner

BK, Simmons PJ, Ferrari M, Tasciotti E. Multi-composite bioactive osteogenic sponges featuring mesenchymal stem cells, platelet-rich plasma, nanoporous silicon enclosures, and Peptide amphiphiles for rapid bone regeneration. *J Funct Biomater*. 2011;2(2):39-66

[95] Murray PE. Platelet-Rich Plasma and Platelet-Rich Fibrin Can Induce Apical Closure More Frequently Than Blood-Clot Revascularization for the Regeneration of Immature Permanent Teeth: A Meta-Analysis of Clinical Efficacy. *Front Bioeng Biotechnol*. 2018;6:139.

[96] Nait Lechguer A, Kuchler-Bopp S, Hu B, Haïkel Y, Lesot H. Vascularization of engineered teeth. *J Dent Res*. 2008;87(12):1138-43.

[97] Niida S, Kaku M, Amano H, Yoshida H, Nishikawa S, Tanne K, Maeda N, Nishikawa SI, Koadama H. Vascular endothelial growth factor can substitute for macrophage colony-stimulating factor in the support of osteoclastic bone resorption. *Journal of Experimental Medicine*. 1999; 190:293-298.

[98] Noden DM, Schneider RA. Neural crest cells and the community of plan for craniofacial development: historical debates and current perspectives. *Adv Exp Med Biol*. 2006;589:1-23.

[99] O'Brien CA. Control of RANKL Gene Expression. *Bone*. 2010; 46(4): 911–919

[100] Ono T, Hayashi M, Sasaki F, Nakashima T. RANKL biology: bone metabolism, the immune system, and beyond. *Inflamm Regen*. 2020;40:2.

[101] Oralová V, Chlastáková I, Radlanski RJ, Matalová E. Distribution of BMP6 in the alveolar bone during mouse mandibular molar eruption. *Connect Tissue Res*. 2014;55(5-6):357-66.

[102] Oshima M, Mizuno M, Imamura A, Ogawa M, Yasukawa M, Yamazaki H, Morita R, Ikeda E, Nakao K, Takano-Yamamoto T, Kasugai S, Saito M, Tsuji T. Functional tooth regeneration using a bioengineered tooth unit as a mature organ replacement regenerative therapy. *PLoS One*. 2011;6(7):e21531.

[103] Otsu K, Kumakami-Sakano M, Fujiwara N, Kikuchi K, Keller L, Lesot H, Harada H. Stem cell sources for tooth regeneration: current status and future prospects. *Front Physiol*. 2014;5:36.

[104] Ou M, Zhao Y, Zhang F, Huang X. Bmp2 and Bmp4 accelerate alveolar bone development. *Connect Tissue Res*. 2015;56(3):204-11.

[105] Ouchi T, Nakagawa T. Mesenchymal stem cell-based tissue regeneration therapies for periodontitis. *Regen Ther*. 2020;14:72-78.

[106] Pan K, Sun Q, Zhang J, Ge S, Li S, Zhao Y, Yang P. Multilineage differentiation of dental follicle cells and the roles of Runx2 over-expression in enhancing

osteoblast/cementoblast-related gene expression in dental follicle cells. *Cell Prolif.* 2010;43(3):219-28.

[107] Panseri S, Montesi M, Dozio SM, Savini E, Tampieri A, Sandri M. Biomimetic Scaffold with Aligned Microporosity Designed for Dentin Regeneration. *Front Bioeng Biotechnol.* 2016;4:48.

[108] Peterková R, Kristenová P, Lesot H, Lisi S, Vonesch JL, Gendrault JL, Peterka M. Different morphotypes of the tabby (EDA) dentition in the mouse mandible result from a defect in the mesio-distal segmentation of dental epithelium. *Orthod Craniofac Res.* 2002;5(4):215-26.

[109] Philbrick WM, Dreyer BE, Nakchbandi IA, Karaplis AC. Parathyroid hormone-related protein is required for tooth eruption. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998;95(20):11846-51.

[110] Pirnazar P, Wolinsky L, Nachnani S, Haake S, Pilloni A, Bernard GW. Bacteriostatic effects of hyaluronic acid. *J Periodontol.* 1999;70(4):370-4.

[111] Polyzos SA, Cundy T, Mantzoros CS. Juvenile Paget disease. *Metabolism.* 2018;80:15-26.

[112] Popa EM, Buchtova M, Tucker AS. Revitalising the rudimentary replacement dentition in the mouse. *Development.* 2019;146(3):dev171363.

[113] Proffit WR, Vig KW. Primary failure of eruption: a possible cause of posterior open-bite. *Am J Orthod.* 1981;80(2):173-90.

[114] Que BG, Wise GE. Tooth eruption molecules enhance MCP-1 gene expression in the dental follicle of the rat. *Dev Dyn.* 1998;212(3):346-51.

[115] Qin H, Yang FS. Calcitonin may be a useful therapeutic agent for osteoclastogenesis syndromes involving premature eruption of the tooth. *Med Hypotheses.* 2008;70(5):1048-50.

[116] Ramesh N, Moratti SC, Dias GJ. Hydroxyapatite-polymer biocomposites for bone regeneration: A review of current trends. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2018;106(5):2046-2057.

[117] Ranganathan K, Lakshminarayanan V. Stem cells of the dental pulp. *Indian J Dent Res.* 2012;23(4):558.

[118] Risom L, Christoffersen L, Daugaard-Jensen J, Hove HD, Andersen HS, Andresen BS, Kreiborg S, Duno M. Identification of six novel PTH1R mutations in families with a history of primary failure of tooth eruption. *PLoS One.* 2013;8(9):e74601.

[119] Roozbehi A1, Joghataie MT, Mehdizadeh M, Mirzaei A, Delaviz H. The effects of cyclosporin-A on functional outcome and axonal regrowth following spinal cord injury in adult rats. *Acta Med Iran.* 2012;50(4):226-32.

- [120] Rothstein M, Bhattacharya D, Simoes-Costa M. The molecular basis of neural crest axial identity. *Dev Biol.* 2018;444 Suppl 1: S170-S180.
- [121] Ruangsawasdi N, Zehnder M, Patcas R, Ghayor C, Siegenthaler B, Gjoksi B, Weber FE. Effects of Stem Cell Factor on Cell Homing During Functional Pulp Regeneration in Human Immature Teeth. *Tissue Eng Part A.* 2017;23(3-4):115-123.
- [122] Sauer B. Inducible gene targeting in mice using the Cre/lox system. *Methods.* 1998;14(4):381-92.
- [123] Schipani E, Kruse K, Jüppner H. A constitutively active mutant PTH-PTHrP receptor in Jansen-type metaphyseal chondrodysplasia. *Science.* 1995;268(5207):98-100.
- [124] Schorn L, Sproll C, Ommerborn M, Naujoks C, Kübler NR, Depprich R. Vertical Bone Regeneration Using rhBMP-2 and VEGF. *Head Face Med.* 2017;13(1):11.
- [125] Shroff B, Kashner JE, Keyser JD, Hebert C, Norris K. Epidermal growth factor and epidermal growth factor-receptor expression in the mouse dental follicle during tooth eruption. *Arch Oral Biol.* 1996;41(6):613-7.
- [126] Simon Yc, Chabre C, Lautrou A, Berdal A. Known gene interactions as implicated in craniofacial development. *Orthod Fr.* 2007;78(1):25-37.
- [127] Smith L. A., Liu X., Hu J., Wang P., Ma P. X. Enhancing osteogenic differentiation of mouse embryonic stem cells by nanofibers. *Tissue Engineering Part: A.* 2009;15(7):1855-1864.
- [128] Strub M, Kramer E, Manière MC, Wagner D. Primary failure of eruption: a French prospective survey among the orthodontists from the Grand Est and Bourgogne-Franche-Comté regions. *Orthod Fr.* 2019;90(2):149-159.
- [129] Sumita Y, Honda MJ, Ohara T, Tsuchiya S, Sagara H, Kagami H, Ueda M. Performance of collagen sponge as a 3-D scaffold for tooth-tissue engineering. *Biomaterials.* 2006;27(17):3238-48.
- [130] Steward AJ, Kelly DJ. Mechanical regulation of mesenchymal stem cell differentiation. *J Anat.* 2015;227(6):717-31.
- [131] Takahashi A, Nagata M, Gupta A, Matsushita Y, Yamaguchi T, Mizuhashi K, Maki K, Ruellas AC, Cevidanes LS, Kronenberg HM, Ono N, Ono W. Autocrine regulation of mesenchymal progenitor cell fates orchestrates tooth eruption. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2019;116(2):575-580.
- [132] Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell.* 2006;126(4):663-76.

- [133] Tao F, Cheng Y, Shi X, Zheng H, Du Y, Xiang W, Deng H. Applications of chitin and chitosan nanofibers in bone regenerative engineering. *Carbohydr Polym.* 2020;230:115658.
- [134] Thesleff I, Sharpe P. Signalling networks regulating dental development. *Mech Dev.* 1997;67(2):111-23.
- [135] Tokavanich N, Gupta A, Nagata M, Takahashi A, Matsushita Y, Yatabe M, Ruellas A, Cevidanes L, Maki K, Yamaguchi T, Ono N, Ono W. A three-dimensional analysis of primary failure of eruption in humans and mice. *Oral Dis.* 2020;26(2):391-400.
- [136] Tsutsui TW, Riminucci M, Holmbeck K, Bianco P, Robey PG. Development of craniofacial structures in transgenic mice with constitutively active PTH/PTHrP receptor. *Bone.* 2008;42(2):321-31.
- [137] Uribe P, Plakwicz P, Larsson L, Czochrowska E, Westerlund A, Ransjö M. Study on site-specific expression of bone formation and resorption factors in human dental follicles. *Eur J Oral Sci.* 2018;126(6):439-448.
- [138] Van Bellinghen X, Idoux-Gillet Y, Pugliano M, Strub M, Bornert F, Clauss F, Schwinté P, Keller L, Benkirane-Jessel N, Kuchler-Bopp S, Lutz JC, Fioretti F. Temporomandibular Joint Regenerative Medicine. *Int J Mol Sci.* 2018;19(2).
- [139] Van der Weijden F, Dell'Acqua F, Slot DE. *J Clin Periodontol.* Alveolar bone dimensional changes of post-extraction sockets in humans: a systematic review. 2009;36(12):1048-58.
- [140] Van Wesenbeeck L, Odgren PR, MacKay CA, D'Angelo M, Safadi FF, Popoff SN, Van Hul W, Marks SC Jr. The osteopetrotic mutation toothless (tl) is a loss-of-function frameshift mutation in the rat *Csf1* gene: Evidence of a crucial role for CSF-1 in osteoclastogenesis and endochondral ossification. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002;99(22):14303-8
- [141] Vi-Fane B, Fernandes I, Davideau JL. *Msx1* and its influence on craniofacial growth. *Orthod Fr.* 2007;78(1):39-48.
- [142] Vilquin JT, Rosset P. Mesenchymal Stem Cells in Bone and Cartilage Repair: Current Status. *Regen Med.* 2006;1(4):589-604.
- [143] Waldon K, Barber SK, Spencer RJ, Duggal MS. Indications for the use of auto-transplantation of teeth in the child and adolescent. *Eur Arch Paediatr Dent.* 2012;13(4):210-6.
- [144] Wang J, Liu X, Jin X, Ma H, Hu J, Ni L, Ma PX. The odontogenic differentiation of human dental pulp stem cells on nanofibrous poly(L-lactic acid) scaffolds in vitro and in vivo. *Acta Biomater.* 2010;6(10):3856-63.

- [145] Wang L, Zheng L, Li C, Dong S, A L, Zhou Y. Adrenomedullin delivery in microsphere-scaffold composite for remodeling of the alveolar bone following tooth extraction: an experimental study in the rat. *Biomed Eng Online*. 2013;12:99.
- [146] Wang Y, Rudym DD, Walsh A, Abrahamsen L, Kim HJ, Kim HS, Kirker-Head C, Kaplan DL. In vivo degradation of three-dimensional silk fibroin scaffolds. *Biomaterials*. 2008;29(24-25):3415-28.
- [147] Wise GE, Frazier-Bowers S, D'Souza RN. Cellular, molecular, and genetic determinants of tooth eruption. *Crit Rev Oral Biol Med*. 2002;13(4):323-34
- [148] Wise GE. Cellular and molecular basis of tooth eruption. *Orthod Craniofac Res*. 2009;12:67-73.
- [149] Wise GE, He H, Gutierrez DL, Ring S, Yao S. Requirement of alveolar bone formation for eruption of rat molars. *Eur J Oral Sci*. 2011;119(5):333-8.
- [150] Wise GE, Que BG, Huang H. Synthesis and secretion of MCP-1 by dental follicle cells-implications for tooth eruption. *J Dent Res*. 1999;78(11):1677-81.
- [151] Wise GE, Yao S, Odgren PR, Pan F. CSF-1 regulation of osteoclastogenesis for tooth eruption. *Journal of Dental Research*. 2005;84(9):837-841.
- [152] Wise GE, Zhao L, Lin F. Effects of epidermal growth factor (EGF) and colony-stimulating factor-1 (CSF-1) on expression of c-fos in rat mandibular molars: implications for tooth eruption. *Cell Tissue Res*. 1996;284(1):1-7.
- [153] Woo KM, Chen VJ, Jung HM, Kim TI, Shin HI, Baek JH, Ryoo HM, Ma PX. Comparative evaluation of nanofibrous scaffolding for bone regeneration in critical-size calvarial defects. *Tissue Eng Part A*. 2009;15(8):2155-62.
- [154] Woo KM, Jun JH, Chen VJ, Seo J, Baek JH, Ryoo HM, Kim GS, Somerman MJ, Ma PX. Nano-fibrous scaffolding promotes osteoblast differentiation and biomineralization. *Biomaterials*. 2007; 28(2): 335-343.
- [155] Xu M, Wei X, Fang J, Xiao L. Combination of SDF-1 and bFGF promotes bone marrow stem cell-mediated periodontal ligament regeneration. *Biosci Rep*. 2019;39(12).
- [156] Xu WP, Zhang W, Asrican R, Kim HJ, Kaplan DL, Yelick PC. Accurately shaped tooth bud cell-derived mineralized tissue formation on silk scaffolds. *Tissue Eng Part A*. 2008;14(4):549-57.
- [157] Yagi H, Soto-Gutierrez A, Parekkadan B, Kitagawa Y, Tompkins RG, Kobayashi N, Yarmush ML. Mesenchymal stem cells: Mechanisms of immunomodulation and homing. *Cell Transplant*. 2010;19(6):667-79.
- [158] Yamamoto H, Cho SW, Song SJ, Hwang HJ, Lee MJ, Kim JY, Jung HS. Characteristic tissue interaction of the diastema region in mice. *Arch Oral Biol*. 2005;50(2):189-98.

- [159] Yamamoto N, Oshima M, Tanaka C, Ogawa M, Nakajima K, Ishida K, Moriyama K, Tsuji T. Functional tooth restoration utilising split germs through re-regionalisation of the tooth-forming field. *Sci Rep.* 2015;5:18393.
- [160] Yao S, Liu D, Pan F, Wise GE. Effect of vascular endothelial growth factor on RANK gene expression in osteoclast precursors and on osteoclastogenesis. *Arch Oral Biol.* 2006;51(7):596-602.
- [161] Young CS, Terada S, Vacanti JP, Honda M, Bartlett JD, Yelick PC. Tissue engineering of complex tooth structures on biodegradable polymer scaffolds. *J Dent Res.* 2002;81(10):695-700.
- [162] Yu T, Volponi AA, Babb R, An Z, Sharpe PT. Stem Cells in Tooth Development, Growth, Repair, and Regeneration. *Curr Top Dev Biol.* 2015;115:187-212.
- [163] Yu X, Liu H, Li C, Du Y, Du Y, Zhang S. Periodontal ligament-associated protein-1 gets involved in the development of osseous eruption canal. *J Mol Histol.* 2019;50(1):35-42.
- [164] Yu X, Zheng F, Du Y, Tang K, Wang W, Zhang S. Semaphorin 3A gets involved in the establishment of mouse tooth eruptive pathway. *J Mol Histol.* 2019;50(5):427-434.
- [165] Zhang L, Morsi Y, Wang Y, Li Y, Ramakrishna S. Review scaffold design and stem cells for tooth regeneration. *Japanese Dental Science Review.* 2013; 49(1): 14-26.
- [166] Zhang Y, Wu C, Luo T, Li S, Cheng X, Miron RJ. Synthesis and inflammatory response of a novel silk fibroin scaffold containing BMP7 adenovirus for bone regeneration. *Bone.* 2012;51(4):704-13.
- [167] Zhang W, Abukawa H, Troulis MJ, Kaban LB, Vacanti JP, Yelick PC. Tissue engineered hybrid tooth-bone constructs. *Methods.* 2009;47(2):122-8.
- [168] Zhang W, Walboomers XF, van Kuppevelt TH, Daamen WF, Bian Z, Jansen JA. The performance of human dental pulp stem cells on different three-dimensional scaffold materials. *Biomaterials.* 2006;27(33):5658-68.
- [169] Zhou T, Pan J, Wu P, Huang R, Du W, Zhou Y, Wan M, Fan Y, Xu X, Zhou X, Zheng L, Zhou X. Dental Follicle Cells: Roles in Development and Beyond. *Stem Cells Int.* 2019;2019:9159605.

Figure 1 : Schéma du développement dentaire (selon Ikeda *et al.*, 2019) [53].

Figure 2: Vue linguale (A) et occlusale (B) de molaires humaines (reconstruction volumique à partir d'acquisitions par CBCT, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, Pôle de MCB, UF de Radiologie).

Figure 3 : Vue latérale (A) et occlusale (B) des molaires maxillaires d'une souris « Wild Type » par micro-tomographie à faisceau volumique (reconstruction volumique à partir d'acquisitions réalisées au Biomaterials Science Center, Basel).

Figure 4 : Localisation des fibres du nerf trijumeau à différents stades de développement au cours de l'histomorphogenèse de la première molaire mandibulaire de la souris (selon Lukko *et al.*, 2014) [79].

Figure 5 : Localisation du ganglion trigéminal chez la souris (schéma adapté de Leijon *et al.*, 2019 [69]).

Figure 6 : Représentation schématique de la distribution de NGF (en jaune) et de son récepteur (NGF-R) (en vert) dans la première molaire inférieure au cours des étapes successives de l'odontogenèse chez le rat (selon Mitsiadis *et al.*, 1992) [90].

Figure 7 : Modèle schématique des interactions moléculaires pendant la formation de la dent et du guidage des axones par la Sema3A et d'autres voies de signalisation associées (selon Lukko *et al.*, 2014) [79].

Figure 8 : Image en microscopie électronique à balayage (MEB) d'une éponge de collagène et son réseau de pores interconnectés (A), avec des pores uniformes de l'ordre de 200 à 500  $\mu\text{m}$ , permettant l'angiogenèse et l'intégration tissulaire pour l'ingénierie tissulaire *in vivo* (B). Éponges de collagène recouvertes d'un fin revêtement de surface minéralisé après application de peptides amphiphiles et deux jours de culture *in vitro* dans un milieu ostéogénique (C) (selon Murphy *et al.*, 2011) [94].

Figure 9 : Processus de bio-impression de complexes pulpo-dentaires en 3D. (a) bio-imprimante 3D et (b) processus d'impression pour produire des complexes pulpo-dentaires 3D patient-spécifiques. Le complexe a été construit par impression de PCL et de deux bio-encres pour la dentine et le tissu pulpaire, couche par couche (selon Han *et al.*, 2019) [44].

Figure 10 : Images en MEB de microsphères de chitosan (CMs) avec de l'adrénomédulline (ADM) (a) et « scaffold » de PLGA/nHA (nano-hydroxyapatite) (b) préparées en présence de CMs-ADM. Les flèches blanches montrent les microsphères de chitosan et les noires celles de nHA sur le scaffold (selon Wang *et al.*, 2013) [145].

Figure 11 : Structure tridimensionnelle en MEB des pores formés par les fibres de soie (A) et des « scaffolds » composites fibres de soie – gélatine (B), fibres de soie – hydroxyapatite (C) et fibres de soie – gélatine – hydroxyapatite (D) (selon Moisenovich *et al.*, 2014) [92].

Figure 12 : Analyse en MEB. (A) Coupe longitudinale et (B) coupe transversale du « scaffold » hybride lyophilisé MgHA-Gel/Alginate. (C) : détail des microparticules de gélatine minéralisées (MgHA-Gel) fusionnées dans la matrice d'alginate. (D) Coupe longitudinale et (E, F) coupes transversales du « scaffold » lyophilisé Gel/Alginate comme matériau de référence (selon Panseri *et al.*, 2016) [107].

Figure 13 : Vue en MEB du « scaffold » NF/PLLA (nanofibrous (NF) poly(L-lactic acid)) à faible grossissement (selon Wang *et al.*, 2010) [144].

Figure 14 : Aperçu des sous-populations cellulaires des crêtes neurales le long de l'axe antéro-postérieur (selon Rothstein *et al.*, 2018) [120].

Figure 15 : Conception et fabrication de « scaffolds » dentaires humains et de rat par impression 3D (selon Kim *et al.*, 2010) [64].

Figure 16 : Régénération osseuse alvéolaire suite à la transplantation d'une unité dentaire obtenue par bio-ingénierie (selon Oshima *et al.*, 2011) [102].

Figure 17 : Mécanismes d'action de la ciclosporine A (CsA) (selon Kokten *et al.*, 2014) [65].

Figure 18 : Principe de l'électrospinning (selon Ghosal *et al.*, 2018) [40].

Figure 19 : Observation d'implants nanofibreux biomimétiques en MEB. Implant en poly( $\epsilon$ -caprolactone) avec un réseau de nanofibres électrospinnées imitant la matrice du tissu conjonctif (A). Implant en poly( $\epsilon$ -caprolactone) fonctionnalisés avec des nanoréservoirs de facteurs de croissance à la surface des nanofibres (B) (selon Van Bellinghen *et al.*, 2018) [138].

Figure 20 : Protocole schématisé des réassociations épithélio-mésenchymateuses associées aux cellules issues de la moelle osseuse.

Figure 21 : Protocole d'implantation en site osseux maxillaire.

Figure 22 : Régénération osseuse maxillaire et membrane PCL-BMP-2-ibuprofène : protocole.

Figure 23 : La signalisation paracrine entre le réticulum étoilé et le follicule dentaire (DF) entraîne la synthèse et la sécrétion de molécules chimiotactiques, du facteur 1 de stimulation des colonies (CSF-1) et de la protéine chimiotactique monocyttaire 1 (MCP-1) pour le recrutement de cellules mononucléaires (selon Wise *et al.*, 2002) [147].

Figure 24 : Diagramme récapitulatif des voies médiées par les protéines G activées par la PTH (selon Bastepe *et al.*, 2017) [7].

Figure 25 : Représentation schématisée des principales interactions moléculaires impliquées dans les processus d'éruption dentaire.

Figure 26 : Développement de la première molaire en contraste de phase et localisation de PTHR1 par immunofluorescence à différents temps de vie.

Figure 27 : Évolution de la première molaire inférieure de souris entre PN12, PN16 et PN20 (coloration hématoxyline-éosine).

Figure 28 : Degré d'éruption de la première molaire dans la cavité buccale à PN16 et à PN20 et localisation de PTHR1 par immunofluorescence.

Figure 29 : Installation de l'animal en décubitus dorsal.

Figure 30 : Représentation schématique du protocole chirurgical d'implantation d'un germe de molaire (ED=14) associé à une membrane de polycaprolactone.

Figure 31 : Coupes histologiques des germes (ED14) implantés avec une membrane de PCL (RS) ou sans membrane (LS), à 3, 4, 5, et 6 semaines post-opératoires (coloration de Mallory).

Figure 32 : Développement et éruption des germes implantés en site intra-osseux maxillaire, avec ou sans membrane nanofibreuse de polycaprolactone.

Figure 33 : Eruption d'une molaire implantée à l'état de germe en zone diastémale avec une membrane de PCL. Coupe frontale (A) et reconstruction volumique (B) à partir des acquisitions par micro-CT.

Figure 34 : Mise en évidence des nanoréservoirs de PTH après observation en microscopie électronique à balayage.

Figure 35 : DPE touchant plusieurs quadrants en denture permanente (selon Strub *et al.*, 2019) [128].

Figure 36 : Première molaire maxillaire incluse présentant une résorption interne étendue (selon Strub *et al.*, 2019) [128].

Figure 37 : Localisation du gène PTHR1 sur le chromosome 3 [38].

Figure 38 : Comparaison des crânes de souris adultes de type sauvage et des souris knock-out *PTHrP* (selon Philbrick *et al.*, 1988) [109].

Figure 39 : Représentation schématique du système de recombinaison Cre<sup>ERT2</sup>.

Figure 40 : La suppression de PPR dans les cellules PTHrP-creER du FD reprend en partie les caractéristiques de DPE chez l'humain (selon Takahashi *et al.*, 2019) [131].

Figure 41 : Dispositif de traction orthodontique ancré sur les incisives (in) maxillaires en antérieur et sur la première molaire maxillaire (m1) en postérieur.

Tableau 1 : Mutations du gène PTHR1 à l'origine de défauts primaires d'éruption (d'après Hanisch *et al.*, 2018 [45]).