



HAL
open science

Influence de la rigidité du substrat sur la migration des cellules souches de la pulpe dentaire

Claire Ehlinger

► **To cite this version:**

Claire Ehlinger. Influence de la rigidité du substrat sur la migration des cellules souches de la pulpe dentaire. Biophysique [physics.bio-ph]. Université de Strasbourg, 2020. Français. NNT : 2020STRAE001 . tel-03550294

HAL Id: tel-03550294

<https://theses.hal.science/tel-03550294v1>

Submitted on 1 Feb 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 Physique et Chimie-Physique
INSERM Unité1121 Biomatériaux et Bioingénierie

THÈSE présentée par : **Claire EHLINGER**

soutenue le : **17 janvier 2020**

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'Université de Strasbourg**

Discipline / Spécialité : **Biophysique**

Influence de la rigidité du substrat sur la migration des cellules souches de la pulpe dentaire

THÈSE dirigée par :

M. Youssef HAIKEL

Professeur, Université de Strasbourg

M. Dominique VAUTIER

Ingénieur de recherche, Université de Strasbourg

RAPPORTEURS :

Mme Catherine PICART

Professeure, Université de Grenoble et CNRS

M. Pierre WEISS

Professeur, Université de Nantes

“Science is a way of thinking much more than it is a body of knowledge.”

Carl Sagan

Remerciements

Je souhaite tout d'abord remercier mon directeur de thèse et chef d'unité fonctionnelle, le Pr Youssef Haikel, de m'avoir accueillie au sein de son équipe de soin et de son équipe de recherche. Vous m'avez donné la chance de m'épanouir auprès de nos étudiants et de nos patients et de réaliser ce doctorat au sein d'une équipe de renom. L'intérêt que vous portez à ma carrière et l'énergie que vous investissez pour lui permettre de prendre racine sont un véritable honneur. Je vous remercie également pour l'écoute dont vous avez fait preuve dans les moments les plus difficiles et du soutien que vous m'avez témoigné.

Je tiens à exprimer ma reconnaissance à mon directeur de thèse, le Dr Dominique Vautier pour son soutien de chaque instant. J'ai commencé cette thèse avec tout à apprendre, mais tu as eu la patience de m'accompagner à la paillasse et faire preuve de bienveillance envers mes questions et mes erreurs. Cette thèse n'a pas toujours été composée de moments faciles, mais tu as su me redonner confiance lorsque les résultats semblaient discordants ou les expériences impossibles à réaliser. Tu es l'étincelle de passion qui a démarré ce travail et le souffle d'humanité qui a permis de l'entretenir.

J'adresse tous mes remerciements aux membres du jury pour l'honneur qu'ils me font en acceptant de juger ce travail. Je tiens à exprimer toute ma reconnaissance à Mme Catherine Picart, Professeure à l'Universités de Grenoble et à M. Pierre Weiss, Professeur à l'Universités à Nantes. Je vous suis reconnaissante d'avoir accepté de faire ce long trajet jusqu'à Strasbourg en plein cœur de l'hivers, sans même pouvoir profiter de l'atmosphère festive du marché de Noël.

Je tiens à remercier la Dre Leyla Kocgozlu, membre invitée de ce jury, pour son investissement dans ce travail. Tes connaissances et expériences passées ont apporté plusieurs idées qui ont souvent été de vrais défis. Merci de m'avoir encouragée à dépasser les limites de ce qui me semblait possible pour arriver à ce résultat.

Je tiens à témoigner toute ma gratitude au Pr Pierre Schaaf et au Dr Lavallo de m'avoir accueillie au sein de l'UMR 1121. Je suis très sensible à l'attention que vous avez porté à mon travail et au soutien dont vous avez fait preuve pour m'aider à concrétiser ma publication dans *l'International*

Journal of Peptide Science and Therapeutics. Votre implication et vos témoignages de sympathie ont toujours été un réel réconfort pour moi.

Je souhaite adresser mes remerciements à tous ceux qui ont contribué à la réalisation des travaux décrits dans les matériel et méthodes. Consignés dans ce manuscrit, ces protocoles expérimentaux semblent faciles, mais je n'oublie pas vos efforts qui ont contribué à ces résultats.

A ce titre, j'exprime ma gratitude au Pr Florent Meyer pour son aide à l'isolation et la mise en culture des DPSCs. Florent, je te remercie pour ces longues discussions sur les meilleures techniques de traitement des DPSCs, la meilleure manière de joindre Béatrice, ou simplement la façon la plus optimale de combiner la vie d'AHU à celle de doctorant. Nos discussions ont toujours été une source de travail supplémentaire, mais également de bonne humeur.

Je remercie chaleureusement le Dr Grégory Francius de m'avoir accueillie au LCPME. Merci pour ta gentillesse et ta patience à toutes épreuves, malgré les difficultés techniques des mesures réalisées et les questionnements incessants que nous t'avons soumis. Ces 6 jours passés à Nancy ont été passionnants et instructifs.

J'adresse mes remerciements à la Dre Béatrice Uring-Lambert qui a eu la patience de m'expliquer les principes de la cytométrie en flux et de passer autant de cellules que nécessaire. Je me souviens de ce café à 8h un matin où il était crucial de passer les échantillons. Votre patience et votre gentillesse sont pour moi un modèle. J'espère pouvoir un jour aider des doctorants comme vous m'avez aidée.

Merci à Morgane Rabineau de m'avoir formée aux techniques de microscopie optique ainsi qu'à la vidéomicroscopie et aux méthodes d'analyses des images réalisées. Je te suis très reconnaissante pour toute l'aide que tu m'as apportée face aux problèmes techniques imprévus. Merci également d'avoir pris le temps de réaliser la planche de MET.

Merci à Eric Mathieu de s'acharner depuis plus de six mois à la réalisation des images en MET des noyaux des DPSCs qui sont une part essentielle de ce travail.

Merci à Christine Affolter-Zbaraszczuk pour ton aide en culture cellulaire auprès des DPSCs comme des NIH 3T3.

Merci à Vincent Ball d'avoir réalisé la caractérisation du module de Young des matrices PDMS. Je te remercie aussi pour ton enseignement extrêmement agréable et passionnant au cours de mes années d'étude d'odontologie.

Merci à Mathieu, qui apparaîtra deux fois dans ces remerciements, pour l'aide que tu m'as apportée pour réaliser les magnifiques graphes, qui illuminent la page 137 de leur splendeur. Quand je

pense que chacun d'eux m'aurait pris 3 heures au moins sans ton aide, je réalise à quel point ta contribution a sauvé ma qualité de vie des trois dernières années. Je te remercie infiniment, pour TheOne, DOM, TADOM et BIRD qui ont été mes plus fidèles compagnons lorsqu'il s'agissait d'affronter Excel. Tu es un génie, aussi bien au sens propre, qu'au figuré.

Merci à Hélène Knopf, à Céline Muller, à Cynthia Calligaro, Géraldine Koenig, Varvara Gribova, Julien Barthes, Sophie Helle et Cosette Betscha, de m'avoir guidée au travers les innombrables armoires, frigos, produits et outils que rescelle l'UMR 1121.

Je souhaite également remercier de tout cœur la Dre Céline Marban et la Dre Marie-Hélène Metz-Boutigue pour leur encadrement au sujet de la combinaison de l'hydroxyde de calcium avec la D-Cateslytine et sans qui l'article paru dans l'IJPRT n'aurait pas vu le jour. Dans cette aventure, j'adresse des remerciements particuliers à Abdurraouf Zaet d'avoir guidé mes premiers pas en microbiologie et d'avoir toujours été disponible pour répondre à mes très nombreuses questions.

J'ai souvent été une doctorante absente car j'ai beaucoup voyagé entre les bureaux, les sites de recherche, les lieux de cours et mon lieu de soin. Je n'ai donc pas eu le temps de partager beaucoup de souvenirs avec ceux avec qui je n'ai pas activement travaillé. Merci à Christiane de m'avoir permis de garder mes repères avec les cafés matinaux partagés en son agréable compagnie. Tu as été une alliée précieuse dans des moments critiques d'organisation et je t'en suis extrêmement reconnaissante.

J'adresse également un remerciement spécial à Gaétan Lutzweiller, pour son agréable compagnie en culture cellulaire et au bureau. Les moments passés en ta compagnie ont toujours égayé ce que j'étais en train de faire (même le tracking cellulaire...). Je remercie aussi les nombreux occupants du bureau de la station de vidéomicroscopie qui m'ont accueillie dans leurs discussions : Morgane, Annie, Géraldine, Ludivine, Claire, Jean-Yves, Gaétan et tous ceux dont j'ai peut-être oublié le nom. Je remercie aussi tous les autres doctorants pour les rares moments passés ensemble : Angela, Sarah, Manon, Salima, Lorène, Pauline, Sébastien, Saït, Eya, Léa, Esteban, Emine, Nicolas, Naji, Adrien, Isabelle et Anne. J'émet aussi une petite pensée pour les stagiaires avec qui j'ai pu échanger quelques mots comme Lauren, Morgane, Juliette, Megan et Sumaya.

J'adresse une mention spéciale à Bernard Senger, qui a eu la gentillesse de supporter mes absences prolongées tout en rappelant à d'éventuels visiteurs que, si si, ce bureau désertique était bien occupé par quelqu'un. Mais mes remerciements s'étendent bien au-delà d'une simple affaire de bureau. Je te remercie également pour tes conseils et ton aide au sujet des statistiques et des graphes du papier

de l'IJPR qui n'aurait pas pu être publié sans ton aide. Il est également indispensable de préciser que cette thèse comporterait beaucoup de fautes de français supplémentaires si tu ne l'avais pas relue. Les écureuils thérapeutiques te remercient également de leur avoir permis de ne pas figurer dans ce travail (ils sont terriblement timides). Tu m'as non seulement aidée techniquement, mais surtout moralement lorsque j'étais abattue. Tel Sisyphe, tu as remonté ce gros caillou qui me servait de moral autant de fois que nécessaire, ce qui relève, je pense, de l'exploit. Je me réjouis de continuer à travailler encore un peu à tes côtés et j'espère que nous réaliserons d'autres exploits que la fameuse opération intitulée : « Sauvons le soldat publi à l'ancienne ».

Je remercie la Faculté de Chirurgie Dentaire et le Pôle de Médecine et de Chirurgie Bucco-Dentaires de Strasbourg et particulièrement la Pre Corinne Taddéi et la Pre Anne-Marie Musset de m'avoir permis d'intégrer vos deux grandes et prestigieuses maisons. Faire partie de vos équipes est un honneur et un plaisir sans cesse renouvelés.

J'adresse également tous mes remerciements à la Pre Maryline Minoux de m'accepter dans ses vacations cliniques depuis presque 5 ans. Travailler à tes côtés est un véritable honneur, bien qu'il soit souvent douloureux de constater à quel point ton savoir-faire et ta connaissance me dépassent. Ta compétence et ta rigueur me laissent penser que je ne serais jamais tout à fait digne d'être ta collègue, mais me motivent à rester à tes côtés pour continuer à apprendre et si possible te soutenir à chaque fois que l'occasion se présentera.

Je remercie également tous mes collègues cliniciens pour les vacations partagées et votre esprit d'équipe.

J'adresse des remerciements tout particuliers à François, qui est avec moi depuis le début. Je me souviens de notre rencontre dans un cours de Master 2 alors que tu attendais ton premier fils. Étions-nous vraiment conscients alors du parcours du combattant dans lequel nous nous étions lancés ? Je me souviens de périodes extrêmement difficiles, quand nous manquions de temps pour nos thèses et de matériel pour soigner nos patients. Ta présence m'a aidée à traverser ces moments et m'a motivée à surmonter mes doutes. J'espère t'avoir également aidé en retour. J'espère que nous sommes tous les deux au seuil de cette nouvelle vie de maître de conférences, que je me réjouis de commencer à tes côtés.

Bien que je sois extrêmement sensible au soutien de mon entourage professionnel, il serait injuste que je ne mentionne pas mon entourage personnel.

Maman, il est évident que tu ne liras pas ces phrases, mais si d'autres les lisent, je voudrais qu'ils sachent tout ce que tu m'as apporté. Ton éducation spartiate et ton amour sans limite m'ont donné la force et la capacité de travail de réaliser tout ce que j'ai accompli. Cette thèse, cette carrière, mais également mes accomplissements personnels n'auraient jamais vu le jour si tu ne m'avais pas convaincue que j'en étais capable. Merci.

Papa, je te remercie pour les histoires, pour les crêpes, les parties de cache-cache, les matins « opéra » ... Pour ces petits moments de plaisir que tu m'as apporté quand j'étais petite et pour le financement grâce auquel j'ai pu réaliser ces études qui n'en finissent pas. La vie nous a parfois un peu éloignés, mais c'est toujours un plaisir de te retrouver pour discuter de tout et de rien et passer de bons moments autour d'un repas, d'un musée ou d'un spectacle.

Thibaut, Mathieu et Flora, je vous remercie pour la vie que nous avons partagée lorsque nous étions petits et pour les souvenirs que nous allons construire. Nous avons été des enfants agités et vous m'en avez fait voir de toutes les couleurs, mais mon enfance aurait été bien fade sans vous. Merci d'avoir été des frères et sœur plein de vie et de surprises et merci d'être devenus ces formidables adultes, sur qui j'ai le plaisir et la chance de pouvoir compter.

Restent mes amis que je ne pense pas avoir besoin de citer pour qu'ils se reconnaissent. Vous avez illuminé ma vie d'adulte par vos innombrables qualités et vos petits défauts. Chaque moment passé à vos côtés m'a apporté son lot de surprises, de bonheur et de rire. Je vous suis reconnaissante d'avoir animé les plus beaux moments de ma vie d'adulte, mais aussi d'être restés pour m'aider à traverser les plus sombres. Je souhaite sincèrement que nous vieillissions ensemble pour continuer à partager tous ces moments avec vous. Je vous remercie également pour vos engagements divers, qui rendent le monde meilleur tant d'un point de vue écologique et social. Je remercie tout spécialement Anaé pour le combat qu'elle mène et les victoires qu'elle remporte. Ton engagement est un pas de plus vers une société plus juste.

Il est délicat de remercier Loïc pour tout le bonheur qu'il m'apporte dans un document officiel. Je préfère donc m'abstenir et te prouver ma reconnaissance au cours des nombreuses années que nous passerons ensemble, de lendemain en lendemain.

Table des matières

Liste des abréviations.....	1
Liste des figures et des tableaux	5
Résumé de thèse.....	9
Introduction.....	15
Chapitre 1. Ingénierie tissulaire dentaire	19
1.1 Problème de santé publique.....	21
1.2 Ingénierie tissulaire dentaire.....	23
1.2.1 Historique.....	23
1.2.2 Prérequis.....	24
1.2.3 Transplantation cellulaire et cell-homing.....	32
1.2.4 Cell homing.....	34
Chapitre 2. Migration et mécanotransduction.....	37
2.1 Migration.....	39
2.1.1 Acteurs de la migration.....	39
2.1.2 Mécanismes de migration.....	44
2.1.3 Inhibition du cytosquelette d'actine.....	46
2.2 Mécanotransduction	48
2.2.1 Rôle de YAP/TAZ dans la mécanotransduction.....	49
2.2.2 Mécanismes de régulation de l'activité de YAP/TAZ.....	51
2.2.3 Entrée de YAP/TAZ dans le noyau.....	56
2.3 Chromatine	57
2.3.1 Structure de la chromatine.....	57
2.3.2 Euchromatine et hétérochromatine.....	59
2.3.3 Lien entre condensation de la chromatine et rigidité du substrat.....	61
2.3.4 Condensation de la chromatine et distribution nucléocytoplasmique de YAP/TAZ.....	62
Chapitre 3. Matériel et méthodes	65
3.1 Surfaces étudiées	67
3.1.1 Description des matrices.....	67
3.1.2 Caractérisation des matrices PDMS birigidités.....	69
3.1.3 Résumé des matrices étudiées.....	69
3.1.4 Revêtement des matrices.....	70
3.2 Culture cellulaire	71
3.2.1 Culture cellulaire NIH 3T3.....	71
3.2.2 DPSCs.....	72

3.2.3	Pré-conditionnement des DPSCs.....	76
3.3	Expériences sur la prolifération par mesure de l'activité des phosphatases.....	77
3.4	Microscopie par fluorescence.....	78
3.4.1	Protocole d'immunomarquage des cellules fixées.....	78
3.4.2	Quantification de la viabilité cellulaire.....	79
3.4.3	Observations des cellules au microscope et paramètres mesurés.....	80
3.4.4	Paramètres analysés.....	80
3.5	Microscopie électronique en transmission.....	81
3.5.1	Préparation des échantillons.....	81
3.5.2	Acquisition.....	82
3.5.3	Analyses morphologiques.....	82
3.6	Vidéomicroscopie.....	83
3.6.1	Préparation des échantillons.....	83
3.6.2	Acquisition.....	84
3.6.3	Analyse des données.....	84
3.7	Analyses statistiques.....	85
Chapitre 4. A New Combination with D-Ctl to Eradicate Root Canal Pathogens.....		87
4.1	Introduction.....	88
4.2	Article.....	90
4.3	Résumé.....	100
Chapitre 5 : DPSCs migration responses to microenvironment stiffness independently of YAP nucleocytoplasmic distribution.....		103
5.1	Introduction.....	1045
5.2	Article.....	1066
5.3	Résumé.....	10640
Conclusion générale et perspectives.....		1433
Références bibliographiques.....		147
Annexe.....		1633
Liste des publications.....		1633
Participation à des conférences.....		1643

Liste des abréviations

Lignées cellulaires et micro-organismes

- ABMSC : Alveolar Bone-derived Mesenchymal Stem Cell
- BMSC : Bone Marrow Stromal Cell
- *C. albicans* : *Candida albicans*
- DFPC : Dental Follicle Progenitor Cell
- DPSC : Dental Pulp Stem Cell
- *E. faecalis* : *Enterococcus faecalis*
- *F. nucleatum* : *Fusobacterium nucleatum*
- HGF-1 : Fibroblastes gingivaux humains
- GMSC : Gingival Mesenchymal Stem Cell
- MSC : Mesenchymal Stem Cell
- *P. micra* : *Parvimonas micra*
- *P. intermedia* : *Prevotella intermedia*
- PDLSC : Periodontal Ligament Stem Cell
- SHED : Stem Cell from Human Exfoliated Deciduous teeth
- SCAP : Stem Cell from the Apical Papilla
- TGPC : Tooth Germ Progenitor Cell

Molécules biologiques :

- ARN : Acide RiboNucléique
- Arp2/3 : Actin Related Protein 2-3
- AMOT : Angiomotine
- AMP : Antimicrobial Peptide
- ATP : Adenosine TriPhosphate
- ADN : Acide DésoxyriboNucléique
- BMP : Bone Morphogenetic Protein
- bFGF : Basic Fibroblast Growth Factor
- CAT : Catestatine
- Cdc 42 : Cell division control protein 42 homolog
- CHR : Chromofungine

- D-Ctl : Cateslytine D
- FAK : Focal Adhesion Kinase
- G-CSF : Granulocyte Colony-Stimulating Factor
- GPCR : G protein-coupled receptor
- HAT : histone acetyltransferase
- HBD3 : Human Beta-Defensin-3
- HDAC : Histone désacétylase
- INM : Inner Nuclear Membrane
- L-Ctl : Cateslytine L
- LAD : Lamin-Associated chromatin Domain
- LATS : LARge Tumor Suppressor
- LINC : Linker of nucleoskeleton and cytoskeleton
- MEC : Matrice Extra-Cellulaire
- mDia : Diaphanous-related formin
- MST : Mammalian STE20-like protein
- NES : Nuclear export signal
- NF2 : Neurofibromin 2
- NGF : Nerve Growth Factor
- NLS : Nuclear localization sequence
- PDGF : Platelet-Derived Growth Factor
- Rac : Ras-related C3 botulinum toxin substrate
- RhoA : Ras homolog family member A
- ROCK : Rho-associated protein kinase
- RUNX2 : RUNT-related transcription factor 2
- SDF-1a : Stromal cell-Derived Factor
- TAZ : Transcriptional coactivator with PDZ-binding motif
- TEAD : Transcriptional Enhanced Associate Domain
- TGF-b : Transforming Growth Factor-b
- VEGF : Vascular Endothelial Growth Factor
- YAP : Yes-Associated Protein

Produits de culture cellulaire et réactifs

- Ca(OH)₂ : Hydroxyde de calcium
- DMEM : Dulbecco's Modified Eagle Medium
- EDTA : EthyleneDiamineTetraacetic Acid
- FBS : Fetal Bovine Serum
- HBSS : Hanks' Balanced Salt Solution
- HCl : acide chlorhydrique
- IDR 2018 : Innate Defense Regulator 1018
- MDAT : Mixture of a Detergent, an Acid and a Teracycline isomer
- MEM : Minimum Essential Medium
- NaOH : Hydroxyde de sodium
- PBS : Phosphate Buffered Saline
- PFA : ParaFormAldehyde
- pNPP : para-NitroPhénylPhosphate
- TFA : TriFluoroacetic Acid
- TSA : TrichoStatine A
- WGA : Wheat Germ Agglutinin

Techniques et sociétés

- ATCC : American Type Culture Collection
- HPLC : Chromatographie en phase liquide à haute performance
- ISCT : International Society for Cellular Therapy
- MCB : Minimum bactericidal concentration
- MET : Microscopie Electronique en Transmission
- MIC : Minimum Inhibitory Concentration
- PSM : Poste de Sécurité Microbiologique

Matériaux

- PDMS : Polydiméthylsiloxane

Unités et symboles :

°C :	Degré Celsius
ANOVA :	ANalysis Of VARIance
CO ₂ :	dioxyde de carbone
Da :	Dalton
<i>E</i> :	Module de Young
<i>g</i> :	rapport entre l'accélération considérée et l'accélération de la pesanteur terrestre
<i>G</i> :	module de cisaillement
<i>G'</i> :	module de conservation
<i>G''</i> :	module de perte
<i>h</i> :	heure
<i>min</i> :	minutes
OD :	densité optique ou absorbance
Pa :	Pascal
<i>s</i> :	Secondes
SEM :	Standard error on the mean

Liste des figures et des tableaux

Chapitre 1 : Ingénierie tissulaire dentaire

- **Figure 1** : Schéma d'une molaire saine (Human tooth diagram from Wikimedia Commons by K. D. Schroeder)
- **Figure 2** : Evolution de la réaction pulpaire suite à une carie profonde (Adapté de Lima *et al.* 2015)
- **Figure 3** : Méthodes d'isolations des DPSCs (Hilkens *et al.* 2013)
- **Figure 4** : Applications thérapeutiques potentielles des DPSCs (Chalisserry *et al.* 2017)
- **Figure 5** : Deux stratégies pour le traitement de la régénération pulpaire de la dent permanente mature non vitale (Marotomi *et al.* 2009)

Chapitre 2 : Migration et mécanotransduction

- **Figure 1** : Organisation des différentes structures du cytosquelette (Ladoux *et al.* 2012)
- **Figure 2** : Structure de la myosine II. (Roman *et al.* 2018)
- **Figure 3** : Famille des intégrines (Hynes *et al.* 2002)
- **Figure 4** : Adhésion focale (Ladoux et Nicolas 2012)
- **Figure 5** : Etapes de la migration cellulaire bidimensionnelle (Ladoux et Nicolas 2012)
- **Figure 6** : Rides générées par des fibroblastes sur une matrice en silicone (Harris *et al.* 1980)
- **Figure 7** : Processus chimique et mécanique de mécanotransduction. (Adapté de Kassianidou *et al.* 2019)
- **Figure 8** : Modification de la distribution nucléocytoplasmique de YAP/TAZ en fonction de la forme des cellules et de la rigidité de la MEC (Adapté de Dupont 2016)
- **Figure 9** : Voie de signalisation Hippo-YAP/TAZ. (Adapté de Boopathy et Hong 2019)
- **Figure 10** : Régulation de la voie de signalisation Hippo par la dynamique du cytosquelette d'actine (Seo *et al.* 2018)
- **Figure 11** : Rôle de YAP/TAZ dans la régulation de la tension cytosquelettique (Nair et Wirtz 2019)
- **Figure 12** : Structure de l'euchromatine et de l'hétérochromatine et rôles des HATs et HDACs (Adapté de Gaspar-Maia *et al.* 2011).
- **Figure 13** : Répartition de l'hétérochromatine dans un noyau eucaryote (Adapté de Fedorova et Zink 2003)
- **Figure 14** : Accessibilité de la chromatine (Görisch *et al.* 2005).

Chapitre 3 : Matériel et Méthodes

- **Figure 1** : Structure du polydimethylsiloxane
- **Figure 2** : Surfaces utilisées pour mimer la rigidité des environnements rencontrés par les DPSCs lors de leur migration (Illustration personnelle)
- **Figure 3** : Création des matrices PDMS avec deux rigidités différentes (Illustration personnelle)
- **Tableau 1** : Caractéristiques des matrices utilisées
- **Tableau 2** : Protocole de préparation des solutions de revêtement utilisées
- **Tableau 3** : Liste des anticorps et des fluorochromes utilisés pour la cytométrie en flux
- **Tableau 4** : Concentrations et durées d'incubation des drogues utilisées
- **Tableau 5** : Liste des anticorps primaires utilisés
- **Tableau 6** : Liste des anticorps secondaires utilisés
- **Figure 4** : Définition de la persistance (Adapté de Gorelik et Gautreau 2014)

Chapitre 4 : A new combination with D-Cateslytin to eradicate root canal pathogens

- **Figure 1** : Inhibition d'*E.faecalis* et de *F.nucleatum* par une solution saturée d'hydroxyde de calcium (Ehlinger *et al.* 2019)
- **Figure 2** : Activité antimicrobienne des peptides dérivés de la CgA contre *E. faecalis* (Ehlinger *et al.* 2019)
- **Figure 3** : Stabilité de la D-Cateslytine dans une solution saturée d'hydroxyde de calcium (Ehlinger *et al.* 2019).
- **Figure 4** : Cytotoxicité de l'hydroxyde de calcium sur les fibroblastes gingivaux humains (Ehlinger *et al.* 2019).
- **Figure 5** : Inhibition de la croissance d'*E.faecalis* par différentes combinaisons d'hydroxyde de calcium et de D-Cateslytine (Ehlinger *et al.* 2019)
- **Figure 6** : Stabilité, cytotoxicité et activité antimicrobienne de la combinaison entre hydroxyde de calcium et D-Cateslytine (Ehlinger *et al.* 2019)
- **Figure 7** : Comparaison de la séquence peptidique de la D-Cateslytine avec d'autres peptides amphipathiques efficaces contre les biofilms bactériens (Ehlinger *et al.* 2019)

Chapitre 5 :

- **Figure 1** : Vitesse moyenne et persistance des DPSCs sur du verre en fonction de la protéine de revêtement (Figure personnelle).
- **Figure 2** : Survie, prolifération, différenciation et pourcentage d'hétérochromatine des DPSCs en fonction du module de Young de la matrice (Figure personnelle).
- **Figure 3** : Vitesse de migration moyenne, persistance et longueur des adhésomes des DPSCs et NIH 3T3 en fonction du module de Young de la matrice (Figure personnelle).
- **Figure 4** : Vitesse de migration moyenne, persistance et longueur des adhésomes des DPSCs après inhibition de la myosine II par de la blebbistatine [50 μ M] en fonction du module de Young de la matrice (Figure personnelle).
- **Figure 5** : Vitesse de migration moyenne, persistance et longueur des adhésomes des DPSCs après inhibition du complexe Arp2-3 par CK666 [200 μ M] en fonction du module de Young de la matrice (Figure personnelle).
- **Figure 6** : Vitesse de migration moyenne et persistance des DPSCs après inhibition de la polymérisation des filaments d'actine par de la latrunculine A [1,2 μ M] en fonction du module de Young de la matrice (Figure personnelle).
- **Figure 7** : Distribution nucléocytoplasmique de YAP dans les DPSCs et NIH 3T3 en fonction du module de Young de la matrice avec ou sans inhibition de la dynamique du cytosquelette d'actine (Figure personnelle).
- **Figure 8** : Vitesse de migration moyenne, persistance et morphologie des DPSCs après inhibition des HDACs par de la TSA [50 nM] en fonction du module de Young de la matrice (Figure personnelle).
- **Figure 9** : Migration des DPSCs sur des matrices PDMS birigidités (Figure personnelle).
- **Figure S1** : Caractérisation des cellules isolées (Figure personnelle).
- **Figure S2** : Immunomarquages des intégrines $\alpha 6$ et $\beta 1$ des DPSCs ensemencées sur du verre avec ou sans revêtement par de la laminine (Figure personnelle).
- **Figure S3** : Trajectoire des DPSCs et NIH 3T3 sur des matrices de rigidités différentes avec ou sans inhibition de la dynamique du cytosquelette d'actine. (Figure personnelle).
- **Figure S4** : Localisation de YAP et migration des DPSCs après inhibition de ROCK par Y27632 [50 μ M] (Figure personnelle).
- **Figure S5** : Distribution nucléocytoplasmique de YAP dans les DPSCs après incubation avec de la blebbistatine avec ou sans TSA (Figure personnelle).

Résumé de thèse

Introduction

Cette thèse s'intéresse aux cellules souches de la pulpe dentaire (DPSCs), une lignée cellulaire issue du tissu pulpaire de la dent (Gronthos *et al.* 2000). Les DPSCs sont des cellules souches mésenchymateuses capables de se différencier en cellules adipogéniques, neurogéniques, chondrogéniques et ostéogéniques (Kawashima 2012). A l'état physiologique, ces cellules demeurent quiescentes dans des niches à proximité des vaisseaux sanguins (Shi et Gronthos 2003). Lors d'une agression externe, en particulier la carie dentaire, les DPSCs sont activées par les facteurs de l'inflammation et les facteurs libérés par la déminéralisation de la dentine (Rombouts *et al.* 2016). L'activation des DPSCs provoque leur multiplication, leur migration au contact de la dentine et différenciation en cellules odontoblastiques (About *et al.* 2000, Téclès *et al.* 2005). Lorsque ce mécanisme de défense est dépassé, une infection péri-apicale peut survenir.

Face à cette pathologie, le chirurgien-dentiste ne dispose que d'une solution thérapeutique : l'élimination de l'intégralité du contenu canalaire par une mise en forme mécanique ainsi qu'une décontamination chimique avant d'obturer hermétiquement le canal par une résine inerte (Haute Autorité de Santé 2008). Cette thérapeutique, appelée traitement endodontique, comporte de nombreuses difficultés techniques pouvant mener à la persistance de l'infection (Haute Autorité de Santé 2008, Hülsmann 2016). Ces écueils techniques et thérapeutiques poussent la communauté dentaire à se tourner vers la régénération pulpaire qui pourrait permettre de prolonger la survie de la dent sur l'arcade et améliorer la qualité de vie du patient (Galler et Widbiller 2017).

L'objectif de l'ingénierie tissulaire appliquée à la thérapeutique endodontique est la régénération d'un tissu pulpaire fonctionnel grâce à la combinaison méticuleuse de trois éléments interconnectés : les DPSCs, une matrice et des molécules bioactives. La matrice est un support tridimensionnel mimant la matrice extracellulaire. Son but est de servir de soutien mécanique aux cellules mais également de réguler et favoriser certains comportements cellulaires. Actuellement, deux voies sont explorées en ingénierie tissulaire dentaire : l'autotransplantation cellulaire, consistant à injecter des DPSCs incluses dans une matrice dans un espace canalaire vide et le cell homing, qui consiste à recruter des cellules souches résiduelles au moyen d'une matrice adaptée (Galler et Widbiller 2017). Une problématique majeure de l'ingénierie tissulaire dentaire est le contrôle du phénotype des DPSCs afin de régénérer les fonctions pulpaires. Parmi les nombreux paramètres en jeu, nous avons choisi d'étudier le rôle de

la rigidité du substrat. En effet, au cours de leur vie, les DPSCs sont confrontées à une large gamme de rigidités puisqu'elles migrent du centre de la pulpe, dont la rigidité a été évaluée à 5kPa (Ozcan *et al.* 2016), jusqu'à la dentine, dont le module de Young est de l'ordre du GPa. L'objectif de ce travail est de déterminer l'influence de la rigidité du substrat sur la migration des DPSCs.

Isolation des DPSCs et choix du matériau de revêtement

La première étape de ce travail a été la réalisation des démarches administratives permettant la conservation de déchets de soins humains (les troisièmes molaires mandibulaires) et leur utilisation dans le cadre de la recherche (autorisation C17-78, projet « Cellules souches issues de la pulpe dentaire »). Les DPSCs ont ensuite été isolées à partir de dents de sagesse incluses, extraites pour raisons orthodontiques. Après une phase de mise en culture, les cellules ont été caractérisées par cytométrie en flux. Ces cellules sont positives pour les marqueurs de surface CD73, CD105 et CD146, classiquement décrits pour les DPSCs et négatives pour les marqueurs de surface CD45, CD34, CD14, CD19 et HLA-DR qui sont caractéristiques d'autres lignées cellulaires (Ledesma-Martínez *et al.* 2016). De plus, elles sont capables de se différencier en cellules adipogéniques, osteogéniques et chondrogéniques, confirmant ainsi qu'il s'agit bien de DPSCs.

Le matériau choisi pour mimer la rigidité de la pulpe dentaire est le poly(diméthylsiloxane) (PDMS) que nous avons utilisé avec la gamme de rigidité suivante : 1,5 kPa, 15 kPa et 28 kPa. Un PDMS de rigidité de 2,5 MPa et du verre ont été utilisés comme témoins pour comparer les comportements cellulaires sur des substrats mous et sur des substrats rigides. Le PDMS, matériau inerte pour l'adhésion cellulaire, nécessite un revêtement préalable par une macromolécule de la matrice extracellulaire pour permettre l'adhésion et la migration des DPSCs. La fibronectine, la laminine et le collagène ont été testées par des expériences de vidéomicroscopie de 24 h. La laminine, sur laquelle les DPSCs ont la vitesse de migration et la persistance les plus élevées, a été choisie comme protéine de revêtement pour cette étude.

Influence de la rigidité du substrat sur les comportements cellulaires

Dans un second temps, nous avons étudié l'influence de la rigidité du substrat sur la survie, la prolifération, la différenciation et la migration des DPSCs. Nos résultats ont montré que ces cellules

sont capables de survivre et de proliférer sur la gamme de rigidités étudiée sans se différencier. De plus, les DPSCs s'étalent et migrent sur des substrats mous et rigides. Sur les gels PDMS mous ($E \leq 28\text{kPa}$), les DPSCs génèrent des forces qui déforment la surface du substrat. D'un point de vue quantitatif, la vitesse moyenne des DPSCs augmente à mesure que la rigidité du substrat diminue. Cette augmentation de la vitesse est corrélée à la taille des adhésions focales (vinculine), qui diminue de manière concomitante à la rigidité du substrat.

Lien entre migration et dynamique du cytosquelette d'actine

Le cytosquelette d'actine est la machinerie responsable de la migration (Garcia-Arcos *et al.* 2019). L'inhibition des différentes protéines impliquées dans la dynamique de l'actine permet de comprendre leurs rôles dans le processus de migration. Dans le cas des DPSCs, l'inhibition de la polymérisation du cytosquelette d'actine par la latrunculine A entraîne l'arrondissement des cellules qui ne migrent plus. L'inhibition de la protéine Arp 2/3 par la CK666 entraîne une perte d'adhérence temporaire des cellules qui s'arrondissent pendant quelques minutes avant de s'étaler et reprendre leur migration avec une la vitesse moyenne diminuée sur toutes les rigidités. L'inhibition de la myosine II par de la blebbistatine n'empêche pas la migration des DPSCs qui migrent dans toutes les directions sur toutes les rigidités, mais sans déplacer les rides qu'elles ont générées auparavant. En présence de blebbistatine, la vitesse moyenne des DPSCs est légèrement augmentée sur les substrats durs et inchangée sur les substrats mous.

Influence de la distribution nucléocytoplasmique de YAP sur la migration

La Yes-Associated Protein (YAP) joue un rôle important dans la mécanotransduction (Dupont *et al.* 2011). Elle est connue pour intégrer des signaux mécaniques externes afin de contrôler de multiples aspects du comportement cellulaire (Aragona *et al.* 2013). YAP peut avoir deux localisations : nucléaire ou cytoplasmique qui dépendent de divers paramètres, dont la rigidité du substrat. Par exemple, YAP est cytoplasmique pour les cellules arrondies sur un substrat mou et nucléaire pour les cellules étalées sur un substrat rigide ($>5\text{ kPa}$) (Dupont *et al.* 2011). La mécanotransduction par YAP nécessite l'intégrité et la tension du cytosquelette d'actine (Dupond *et al.* 2011, Das *et al.* 2016).

Pour les DPSCs sans drogue, YAP est localisée dans le noyau sur toutes les rigidités expérimentées. A l'inverse, YAP est cytoplasmique à partir de 28 kPa pour les cellules NIH 3T3 qui sont des fibroblastes matures. Ces résultats suggèrent que pour les DPSCs, le processus de contractilité de la myosine pourrait être efficace sur des substrats rigides et mous. De fait, YAP est cytoplasmique pour toutes les rigidités lorsque la myosine II est inhibée par de la blebbistatine. Ainsi, YAP semble être un relai des signaux mécaniques intégrés par les DPSCs même sur les substrats de faibles rigidités.

Récemment, la littérature a montré que la distribution nucléocytoplasmique de YAP a une influence sur la vitesse de migration (Mason *et al.* 2019). Dans notre cas, la vitesse de migration des DPSCs sur les substrats mous ne varie pas quand YAP est retenue dans le cytoplasme par l'inhibition de la myosine II. La question est de savoir si l'accumulation de YAP dans le noyau en présence de blebbistatine influence la vitesse de migration des DPSCs. Nous avons montré qu'il est possible de maintenir YAP dans le noyau en présence de blebbistatine en incubant les cellules avec de la tricostatine A (TSA) qui provoque l'hyperacétylation des histones et facilite l'accessibilité de la chromatine (Görish *et al.* 2005). Nous avons ensuite analysé les vitesses de migration en présence de blebbistatine avec ou sans TSA. Comme montré précédemment, la vitesse de migration ne varie pas sur les substrats mous en présence de blebbistatine. En présence de TSA et blebbistatine, la vitesse de migration demeure également inchangée. Ces résultats suggèrent que la vitesse de migration des DPSCs sur les substrats mous est indépendante de la localisation intracellulaire de YAP.

Comportement des DPSCs en présence d'un gradient de rigidité

La dernière étape de ce travail s'intéresse à la migration des DPSCs lorsqu'elles sont ensemencées sur une matrice comportant une zone rigide et une zone molle. A cette fin, nous avons créé des matrices PDMS présentant une partie centrale molle et une partie périphérique rigide. Les propriétés mécaniques des PDMS utilisés ont été déterminées par rhéologie. Le PDMS mou présente un module de Young de 35 kPa et le PDMS rigide un module de Young de 400 kPa. Lorsque les DPSCs sont ensemencées à la frontière entre les deux PDMS décrits, elles sont capables de migrer du dur vers le mou et du mou vers le dur alors que les NIH 3T3 ne peuvent migrer que du mou vers le dur. Ce phénomène ne correspond pas à la littérature actuelle qui montre un phénomène de durotaxie pour les cellules souches mésenchymateuses (Vincent *et al.* 2013).

Conclusion et perspectives

En résumé, la vitesse moyenne des DPSCs augmente et la taille des adhésions focales diminue lorsque la rigidité du substrat diminue. L'inhibition de la contraction du cytosquelette n'empêche pas la migration cellulaire, bien qu'elle ait un effet, les forces exercées par les cellules sur les substrats de rigidité inférieure ou égale à 28 kPa et la localisation de YAP. Enfin, la polymérisation de l'actine est essentielle à l'étalement des DPSCs et à la mécanotransduction. Les DPSCs migrent sur des substrats mous indépendamment de l'activité de la myosine II et de la distribution nucléocytoplasmique de YAP. Ces conclusions semblent indiquer que lors de l'activation des DPSCs au cours du processus carieux, leur migration serait d'avantage guidée par le gradient chimique que par un gradient de rigidités.

Introduction

Selon la constitution de l'Organisation Mondiale de la Santé, la santé est « un état de complet bien-être physique, mental et social, et ne consiste pas seulement en une absence de maladie ou d'infirmité ». La santé bucco-dentaire fait partie intégrante de cette définition. En effet, la denture joue un rôle prépondérant dans le bien-être physique puisqu'elle permet la nutrition et facilite la digestion au travers de la mastication. Elle joue également un rôle dans la communication au travers de la phonation, puisqu'elle permet l'appui de la langue nécessaire à la réalisation de certains sons et du sourire qui joue un rôle social important grâce à la sympathie dont il témoigne généralement. Enfin, la denture peut avoir un impact important sur le bien-être mental. En effet, les douleurs ou les gênes fonctionnelles peuvent impacter le quotidien de chaque individu, pouvant entraîner des pertes d'appétit ou des troubles du sommeil. Ces atteintes peuvent également affecter le bien-être psychique de l'individu qui peut être gêné par son sourire. Chez les enfants, un sourire disgracieux peut conduire à des moqueries et à un malaise prononcé.

La carie dentaire s'inscrit pleinement dans cette problématique puisqu'elle touche les individus de toutes les tranches d'âge et toutes les populations avec une incidence variable. Lorsqu'elle n'est pas traitée, la carie peut provoquer une inflammation de la pulpe dentaire nécessitant un traitement endodontique, plus couramment appelé traitement de racine ou « dévitalisation ». Bien que cette procédure ait été codifiée il y a plusieurs décennies, elle garde un taux d'échec variant de 5 à 20% en fonction du type de pathologie et de la population traitée, pouvant entraîner des infections, des douleurs insomniantes voire l'avulsion de la dent, qui génère une perte esthétique et fonctionnelle. Même en l'absence d'échec, le traitement endodontique peut provoquer des dyschromies dentaires et une sensation de « dents en bois » légèrement dérangeante pour le patient. Chez l'enfant, le traitement endodontique provoque l'arrêt de l'édification de la racine, qui fragilise la structure dentaire de manière permanente et augmente les risques de complications ultérieures.

La revascularisation dentaire fait partie des techniques proposées pour palier à ces problématiques chez les enfants présentant des dents immatures atteintes de pathologies endodontiques. Elle nécessite la désinfection de l'espace canalaire et l'induction d'un saignement qui peuvent permettre la recolonisation de la dent par un tissu pulpaire fonctionnel. Bien que des succès thérapeutiques aient été décrits sur dent immature, cette technique a l'inconvénient de ne pas être applicable sur les dents matures.

L'ingénierie tissulaire, ou tissue engineering en anglais, décrit l'ensemble des techniques utilisant les principes et les méthodes de l'ingénierie, de la culture cellulaire, des sciences de la vie et des matériaux pour comprendre les relations entre les structures et les fonctions des tissus, afin de développer des substituts biologiques pouvant restaurer, maintenir ou améliorer les fonctions tissulaires. Elle implique notamment d'identifier et maîtriser les facteurs biochimiques et physico-chimiques de la croissance tissulaire. En général, l'ingénierie tissulaire est basée sur l'utilisation d'une matrice qui servira de support à la croissance de nouveaux tissus, de cellules souches capables de restaurer les organes lésés et de facteurs de croissance permettant de contrôler la régénération tissulaire.

Depuis la découverte de cellules souches mésenchymateuses au sein des tissus pulpaire dentaires, une branche de l'ingénierie tissulaire s'est concentrée sur la régénération de la pulpe dentaire dans l'espoir de pouvoir régénérer la pulpe de dents matures infectées.

Dans ce manuscrit, nous abordons deux aspects essentiels de l'ingénierie tissulaire dentaire. Premièrement, nous nous sommes intéressés à la désinfection canalaire qui doit être réalisée avant chaque procédure de régénération pulpaire afin d'éviter le développement d'une infection qui pourrait empêcher la régénération d'un tissu pulpaire sain. Dans cette optique, nous nous sommes spécifiquement intéressés à la combinaison de deux agents antimicrobiens : l'hydroxyde de calcium et la D-Cateslytine afin de créer une combinaison stable, non toxique, efficace contre les pathogènes endodontiques.

Dans une seconde étape, nous avons étudié l'influence de la rigidité de la matrice sur la migration des cellules souches de la pulpe dentaires. En effet, de nombreuses recherches se sont intéressées au type de matrices, aux facteurs de croissance et à la sous-population de cellules souches à utiliser pour obtenir la régénération d'un tissu pulpaire fonctionnel. Bien que de nombreux aspects aient été développés, notamment au travers de recherches *in vivo* sur l'animal, peu d'intérêt a été porté aux propriétés physiques des matrices utilisées. Pourtant, les dernières décennies ont montré que les propriétés mécaniques de l'environnement comme la rigidité, la tension et la topographie de surface par exemple pouvaient influencer l'adhésion, la migration et la différenciation cellulaires, trois processus cruciaux pour l'ingénierie tissulaire dentaire.

Les mécanismes par lesquels les cellules sont capables de percevoir, d'intégrer et de s'adapter aux signaux physiques de leur environnement grâce au processus de mécanotransduction est un axe de recherche du laboratoire du Pr Pierre Schaaf, l'Unité Inserm 1121 « Biomatériaux et Bioingénierie », et a fait l'objet de trois thèses sous la direction du Pr Youssef Haikel et du Dr Dominique Vautier. Ces travaux ont montré que la rigidité de la matrice impactait la condensation de la chromatine ainsi que la division de cellules cancéreuses (SW480) et de cellules fibroblastiques (Ptk2). Cette thèse de doctorat se situe dans la continuité de ces travaux en s'intéressant à l'influence du module de Young de la matrice sur la migration des cellules souches de la pulpe dentaire ainsi qu'à ses conséquences au niveau nucléaire. L'objectif de cette thèse est de déterminer s'il existerait un module de Young optimal de la matrice permettant le maintien des cellules à l'état quiescent et si la combinaison de plusieurs rigidités permettrait de guider la migration et la différenciation cellulaires lorsque celles-ci sont souhaitées.

Ce mémoire s'articule en 5 parties. Dans la première partie, nous exposons la problématique de santé publique que représentent l'infection pulpaire et le traitement endodontique. Nous détaillons alors les avancées de l'ingénierie tissulaire dentaire et discutons certaines pierres d'achoppement, en particulier les moyens de temporisation entre deux phases de traitement. La seconde partie s'intéresse aux processus cellulaires fondamentaux étudiés dans ce travail. Nous y détaillons les acteurs et mécanismes de la migration bidimensionnelle, puis nous décrivons le phénomène de mécanotransduction ainsi que les voies de signalisation impliquées dans ce phénomène avant de d'aborder le sujet de la chromatine et les facteurs influençant sa condensation en hétérochromatine. L'objectif de cette seconde partie est non seulement d'exposer les données scientifiques sur lesquelles s'appuie ce travail mais surtout de mettre en lumière les interconnexions entre matrice extra-cellulaire, cytosquelette d'actine, localisation nucléocytoplasmique des facteurs de transcription mécanosensibles et condensation de la chromatine. La troisième partie s'attache à décrire les matériels et méthodes utilisés pour la création des matrices, la mise en culture des cellules étudiées et pour les observations réalisées dans le but de répondre aux problématiques évoquées précédemment. La quatrième partie de ce travail s'intéresse plus spécifiquement à l'optimisation de la désinfection canalaire lors des procédures de régénération pulpaire. L'amélioration des propriétés antiseptiques des matériaux de temporisation utilisés semble en effet être une manière d'améliorer le taux de succès des procédures d'autotransplantation cellulaire. La cinquième partie répond à la problématique globale de ce travail en exposant nos résultats sur l'influence de la rigidité sur la migration, la condensation de la chromatine et la localisation des facteurs de transcription mécanosensibles des cellules souches de la pulpe dentaire.

Chapitre 1. Ingénierie tissulaire dentaire

1.1	Problème de santé publique.....	21
1.2	Ingénierie tissulaire dentaire	23
1.2.1	Historique.....	23
1.2.2	Prérequis.....	24
1.2.3	Transplantation cellulaire et cell-homing.....	32
1.2.4	Cell homing.....	34

1.1 Problème de santé publique

La dent est un organe minéralisé constitué d'une partie implantée dans l'os alvéolaire, la racine, et d'une partie visible dans la cavité buccale, la couronne. La dentine représente la majeure partie des tissus minéralisés de la dent. Elle est recouverte d'une couche de ciment au niveau radiculaire et d'une couche d'émail au niveau coronaire. La zone centrale de la dent est constituée d'une cavité pulpaire composée de la chambre pulpaire, localisée dans la couronne et de canaux radiculaires, situés dans les racines dentaires. La pulpe dentaire est un tissu conjonctif lâche, vascularisé et innervé qui communique avec la circulation générale à travers un ou plusieurs foramina situés à l'apex des racines (Figure 1). La pulpe joue un rôle majeur dans la protection de la dent grâce à son innervation, indiquant la présence de stimuli nocifs à travers des sensations douloureuses, et ses diverses cellules immunitaires, empêchant son invasion par des micro-organismes (Hargreaves *et al.* 2002). Lors d'une perte tissulaire liée à de l'usure dentaire, une fracture ou une carie, des odontoblastes, situés à la jonction pulpo-dentinaire, sécrètent la dentine tertiaire réactionnelle permettant d'isoler la pulpe des irritations physico-chimiques ou bactériennes (Hargreaves *et al.* 2002). Parmi les populations cellulaires contenues dans la pulpe, des cellules souches demeurent à l'état quiescent et peuvent se différencier pour remplacer les odontoblastes lésés lors d'une infection ou d'un traumatisme et sécréter de la dentine tertiaire réparatrice (About *et al.* 2000, Shi et Gronthos 2003, Téclès *et al.* 2005). En cas de progression non contrôlée d'une ou plusieurs agressions externes, une réaction d'inflammation de la pulpe dentaire, ou pulpite, peut survenir, provoquant une ischémie du tissu pulpaire et des douleurs intenses (Hargreaves *et al.* 2002). En l'absence de traitement, l'ischémie progresse, entraînant une nécrose pulpaire (Heyeraas et Kvinnsland 1982) (Figure 2). Lorsque cette nécrose est associée à l'invasion bactérienne de la pulpe dentaire, une parodontite apicale peut survenir (Figure 2).

La parodontite apicale est un processus inflammatoire aigu ou chronique, localisé au niveau des apex dentaires (American Association of Endodontists 2009). C'est une pathologie commune qui touche toutes les populations avec une prévalence variable (Persoon et Özok 2017). Elle est généralement causée et entretenue par la contamination de l'espace pulpaire par des pathogènes de la cavité buccale (Nair 2006). La parodontite apicale peut impliquer la résorption des structures périradiculaires (Figure 2), ainsi que des douleurs intenses lorsqu'une pression est appliquée sur la dent atteinte, notamment au cours de la mastication (American Association of Endodontists 2009). Le traitement des dents atteintes de parodontites apicales vise non seulement la disparition des douleurs, mais est essentiel car ces parodontites pourraient être corrélées à des pathologies générales comme des pathologies cardiovasculaires (Caplan *et al.* 2009).

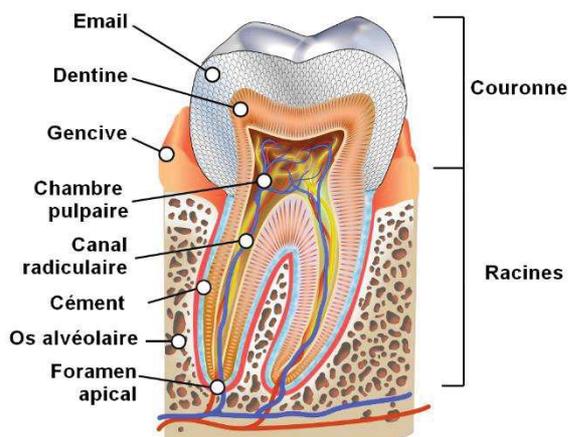


Figure 1 : Schéma d'une molaire saine (Adapté d'un schéma de KD. Schroeder).

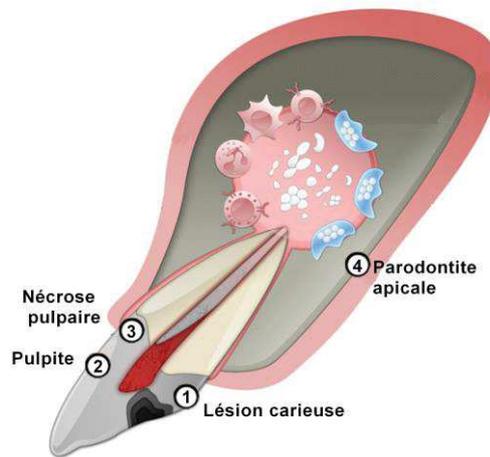


Figure 2 : Evolution de la réaction pulpaire suite à une carie profonde (Adapté de Lima *et al.* 2015).

Actuellement, le traitement endodontique est la prise en charge recommandée pour les dents atteintes de pulpites irréversibles ou de parodontites apicales (American Association of Endodontists 2009). Ce traitement vise à améliorer la santé périapicale en éliminant les agents pathogènes de l'espace pulpaire par une désinfection chimiomécanique (El Karim *et al.* 2007) avant le scellement de l'endodonte par une résine inerte. Bien que l'instrumentation et l'irrigation utilisées en endodontie soient efficaces pour réduire le nombre de microorganismes, elles ne peuvent pas complètement éliminer les pathogènes du canal radiculaire (Haapasalo *et al.* 2005). Par conséquent, si les canaux sont laissés vides entre deux rendez-vous, les bactéries résiduelles peuvent se multiplier et coloniser à nouveau l'endodonte (Mohammadi et Dummer 2011). Pour surmonter ce problème, il est recommandé de remplir l'espace canalaire avec une médication intracanaire ayant des propriétés antimicrobiennes entre les différentes séances d'un traitement endodontique (Mohammadi et Dummer 2011). Globalement, le taux d'échec des traitements endodontiques réalisés sur les dents atteintes de parodontite apicale varie de 12% à 24%. (Chércoles-Ruiz *et al.* 2017). Ces échecs endodontiques peuvent conduire à l'extraction de la dent atteinte, entraînant une perte fonctionnelle pour le patient (Touré *et al.* 2011). Une méta-analyse a montré que le taux de succès du traitement endodontique n'était pas augmenté dans le cas des traitements réalisés en deux séances, avec mise en place d'une médication intracanaire par rapport aux traitements réalisés en une séance (Manfredi *et al.* 2016). L'utilisation d'une médication intracanaire est donc principalement recommandée dans les cas où des obstacles techniques empêchent la réalisation du traitement endodontique en une seule séance (Haute Autorité de Santé, 2008).

Actuellement, de nombreuses recherches visent à augmenter le taux de réussite du traitement endodontique en améliorant les protocoles d'instrumentation, d'irrigation et en développant de nouvelles médications intracanales. Le développement de médications intracanales permettant d'améliorer la décontamination de l'endodonte est à la fois utile pour le traitement endodontique mais également pour la régénération pulpaire. En effet, la présence de pathogènes endodontiques résiduels peut entraîner une infection responsable de l'échec des thérapies entreprises. La première partie de cette thèse concerne cet aspect du traitement endodontique. La seconde partie de ce travail s'intéresse à la régénération d'un tissu pulpaire fonctionnel, qui éviterait les écueils liés aux traitements endodontiques et améliorerait la survie des dents atteintes de pathologies pulpaires, notamment grâce au maintien de l'homéostasie, l'immunité et de la vitalité dentaire. La suite de ce chapitre établit un état de l'art de l'ingénierie tissulaire dentaire afin de préciser le contexte global de cette thèse.

1.2 Ingénierie tissulaire dentaire

1.2.1 Historique

La découverte de cellules souches dans la pulpe des dents permanentes (dental pulp stem cells : DPSCs) (Gronthos *et al.* 2000) a rendu possible l'utilisation de ces cellules souches pour régénérer un tissu pulpaire fonctionnel, même après des atteintes pulpaires irréversibles (Nakashima 2005).

Les premières transplantations de DPSCs en combinaison avec des particules d'hydroxyapatite et de phosphate tricalcique chez des souris immunodéprimées ont entraîné la formation de tissus fibreux ressemblant à de la pulpe dentaire contenant des vaisseaux sanguins et des cellules semblables aux odontoblastes humains (Gronthos *et al.* 2000, Batouli *et al.* 2003).

Des DPSCs ont ensuite étéensemencées dans des matrices biodégradables insérées dans des tranches de dentine de 1 à 2,5 mm d'épaisseur, réalisées à partir de dents humaines extraites (Prescott *et al.* 2008, Demarco *et al.* 2010). Les tranches de dentineensemencées avec des cellules souches ont été implantées dans les tissus sous-cutanés de souris immunodéficientes pendant 14 à 32 jours (Prescott *et al.* 2008, Demarco *et al.* 2010). Lors du retrait des implants, ces équipes ont observé que l'espace canalaire était occupé par un tissu dont les caractéristiques morphologiques et l'architecture ressemblaient à celles d'une pulpe dentaire physiologique (Prescott *et al.* 2008, Demarco *et al.* 2010). Ces travaux ont montré que les DPSCs peuvent se différencier en cellules endothéliales angiogéniques et en odontoblastes capables de générer de la dentine réparatrice (Prescott *et al.* 2008, Demarco *et al.* 2010).

Par la suite, ces expérimentations ont été étendues à des cylindres de dentine (Huang *et al.* 2010, Galler *et al.* 2012, Itoh *et al.* 2018) et finalement à des racines entières (Rosa *et al.* 2013), afin de mieux mimer la situation clinique d'un canal radiculaire long et étroit. Après implantation des cylindres de dentine, contenant les cellules souches et des facteurs de croissances ensemencés dans une matrice biodégradable, dans les tissus sous-cutanés de souris immunodéprimées pendant 5 à 8 semaines, ces équipes ont observé la formation de tissus ressemblant à de la pulpe sur toute la hauteur des échantillons. De plus, les tissus conjonctifs néoformés comportaient une vascularisation et des cellules odontoblastiques sécrétant de la dentine (Huang *et al.* 2010, Galler *et al.* 2012, Rosa *et al.* 2013, Itoh *et al.* 2018). Bien que précurseurs dans le domaine de la régénération tissulaire dentaire, ces protocoles expérimentaux ne reflètent pas complètement la réalité clinique (cylindres dentinaires trop courts, apex élargis artificiellement, racines ouvertes aux deux extrémités...).

1.2.2 Prérequis

La régénération pulpaire repose sur le paradigme classique de l'ingénierie tissulaire, qui implique l'administration de cellules souches et de facteurs de croissance dans une matrice adaptée. Dans ce chapitre, nous détaillerons ces trois éléments.

1.2.2.1 Cellules souches de la pulpe dentaire

Caractérisation des DPSCs

Les cellules souches mésenchymateuses (Mesenchymal Stem Cells : MSCs) sont caractérisées selon les critères définis par l'International Society for Cellular Therapy (ISCT). Selon ces critères, les MSCs sont adhérentes au plastique et expriment à 95% ou plus les marqueurs de surface CD73 (5'-ectonucleotidase), CD90 (glycosylphosphatidylinositol-anchored glycoprotein) et CD105 (endoglin). Pour s'assurer que les MSCs ne soient pas confondues avec d'autres lignées cellulaires, elles doivent également être négatives (positives au maximum à 2%) pour les marqueurs de surfaces :

- CD14, CD11b et HLA-DR : exprimés par les monocytes et les macrophages,
- CD45 : ayant un degré d'expression variable sur les cellules lymphoïdes ou myéloïdes,
- CD34 : retrouvé sur les cellules souches hématopoïétiques et les cellules endothéliales,
- CD79a et CD19 : exprimés par les lymphocytes B.

De plus, les MSCs sont capables de se différencier *in vitro* en lignées adipogènes, ostéogènes et chondrogènes (Dominici *et al.* 2006).

Plusieurs sources de MSCs ont été mises en évidence au niveau des dents humaines et leurs tissus de soutien. Les DPSCs et les cellules souches des dents déciduales exfoliées (Stem Cells from Human Exfoliated Deciduous teeth : SHEDs), issues respectivement du tissu pulpaire des dents permanentes ou temporaires, ont été les premières lignées décrites (Gronthos *et al.* 2000, Miura *et al.* 2003). Des MSCs ont ensuite été isolées à partir des structures à l'origine de la dent comme les cellules progénitrices du follicule dentaire (dental follicle progenitor cells : DFPCs) (Morszeck *et al.* 2005), les cellules souches de la papille apicale (stem cells from the apical papilla : SCAPs) (Sonoyama *et al.* 2006) et les cellules progénitrices de germes dentaires (tooth germ progenitor cells : TGPCs) (Ikeda *et al.* 2008). En parallèle, des MSCs ont été isolées à partir des tissus de soutien dentaire comme les cellules souches du ligament parodontal (periodontal ligament stem cells : PDLSCs) (Seo *et al.* 2004), les MSCs dérivées de l'os alvéolaire (alveolar bone-derived mesenchymal stem cells : ABMSCs) (Matsubara *et al.* 2005) et les MSCs gingivales (gingival mesenchymal stem cells : GMSCs) (Zhang *et al.* 2009).

Les DPSCs sont généralement isolées à partir de troisièmes molaires humaines incluses extraites pour raisons orthodontiques (Gronthos *et al.* 2000), mais sont également retrouvées dans les dents surnuméraires (Huang *et al.* 2008) et dans les pulpes inflammées (Alongi *et al.* 2010). Les DPSCs ont une morphologie typique des fibroblastes et présentent un pouvoir clonogénique important, une prolifération rapide ainsi que la capacité de s'autorenouveler (Gronthos *et al.* 2000). Comme l'ensemble des MSCs, les DPSCs ne semblent pas exprimer un marqueur qui les caractérise spécifiquement et sont donc généralement identifiées grâce aux critères de l'ISCT (Ledesma-Martínez *et al.* 2016).

Plusieurs sous-populations de DPSCs présentant des activités biologiques légèrement différentes ont été mises en évidence. Par exemple, les DPSCs avec un fort potentiel de prolifération ont tendance à exprimer les marqueurs CD44, CD90 et CD166 (Kawashima 2012). Les DPSCs STRO-1+ ont des propriétés odontogéniques et ostéogéniques importantes, tandis que les DPSCs CD34+, CD117+ et CD45- ont une plus grande capacité d'autorenouvellement (Yang *et al.* 2009). D'autre part, la sous-population de DPSCs CD31- et CD105+ a un effet plus important sur l'angiogenèse et la neurogenèse après transplantation que les autres DPSCs (Nakashima et Iohara 2011). Enfin, une sous-population de DPSCs mobilisée par le Granulocyte Colony-Stimulating Factor (G-CSF) a montré un potentiel

angiogénique et neurogéniques supérieur aux DPSCs non mobilisées (Nakashima et Iohara 2014). Cependant, malgré l'augmentation du nombre de nouveaux marqueurs pour caractériser les DPSCs, la plupart des études fondamentales et précliniques utilisent l'immunophénotype proposé par l'ISCT pour identifier les MSCs (Ledesma-Martínez *et al.* 2016).

Lorsque les cellules sont cultivées dans les conditions adéquates, les DPSCs ont la capacité de se différencier en adipocytes, odontoblastes, ostéoblastes, chondrocytes, myoblastes et cellules neurales (Zhang *et al.* 2006, Hilkens *et al.* 2013). La caractéristique la plus frappante des DPSCs est leur capacité à régénérer un complexe pulpo-dentinaire composé d'une matrice minéralisée avec des tubulis tapissés d'odontoblastes et d'un tissu conjonctif contenant des vaisseaux sanguins dont l'agencement est semblable à celui du complexe pulpo-dentinaire des dents humaines (Gronthos *et al.* 2000).

Isolation et culture des DPSCs

Les DPSCs peuvent être isolées à partir des tissus pulpaire selon deux protocoles : la digestion enzymatique ou la technique des explants (Hilkens *et al.* 2013) (Figure 3). La première technique implique le hachage de la pulpe dentaire puis la digestion du tissu pulpaire par un mélange de dispase et de collagénase avant la mise en culture (Figure 3a). Dans le second protocole, les fragments obtenus sont déposés en présence du milieu de culture sur une surface en plastique sur laquelle les DPSCs adhèrent et migrent (Figure 3b). Une étude a montré que les DPSCs isolées selon ces deux méthodes avaient des caractéristiques similaires (Hilkens *et al.* 2013).

Par ailleurs, les DPSCs peuvent être cryopréservées sans perdre leur potentiel de prolifération ni de différenciation (Zhang *et al.* 2006). Concernant le nombre de passages maximum, des études ont montré que les DPSCs peuvent être cultivées pendant de longues périodes sans compromettre leurs caractéristiques (Laino *et al.* 2005, Suchánek *et al.* 2010). Cependant, il est généralement admis qu'une période d'expansion prolongée peut induire la sénescence et qu'après 20 à 40 doublements de population, les MSCs peuvent perdre leur capacité à se différencier (Ledesma-Martínez *et al.* 2016). Généralement, les DPSCs sont utilisées *in vitro* jusqu'aux passages 5 à 10.

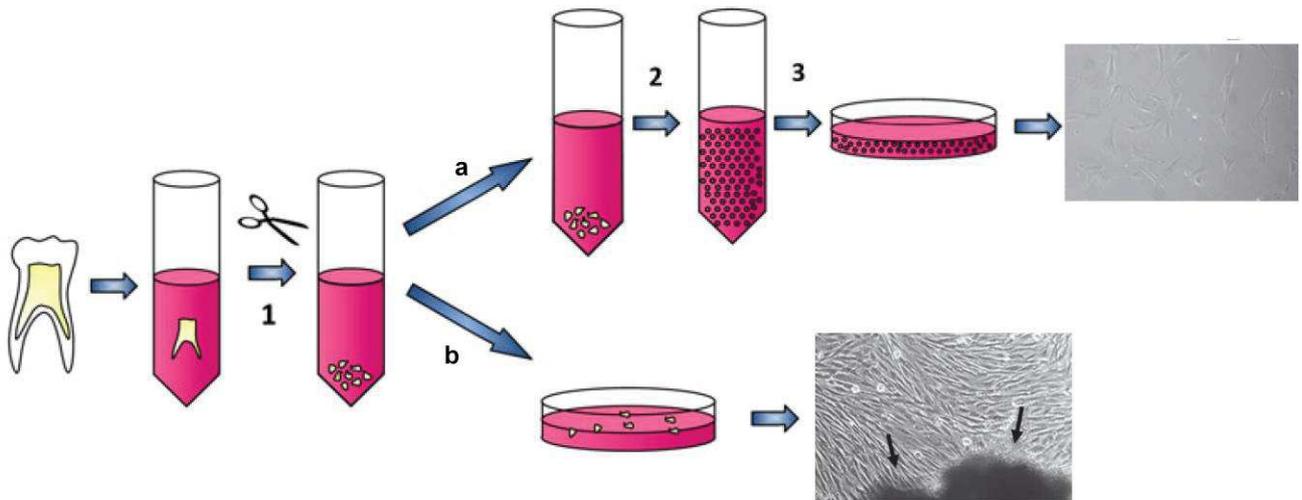


Figure 3 : Méthodes d'isolation des DPSCs. (1) Le tissu pulpaire est isolé et coupé en morceaux de 1 mm³. (a) Digestion enzymatique : les fragments de tissus sont incubés dans une solution de collagénase/dispase pendant 1 h à 37°C (2). Cette solution est centrifugée à 300 g et passée dans un filtre cellulaire, puis la suspension unicellulaire obtenue est ensemencée (3). (b) Méthode des explants : les fragments de tissus sont répartis sur du plastique. Après 48 à 72 h, ils adhèrent à la surface et les cellules souches peuvent se développer (Hilkens *et al.* 2013).

Applications cliniques des DPSCs

Les DPSCs sont une source de MSCs facilement accessible puisqu'elles peuvent être isolées à partir de dents de sagesse extraites, qui sont considérées comme des déchets biologiques. Actuellement, les applications thérapeutiques des DPSCs sont étudiées dans de nombreux domaines médicaux (Figure 4).

Dans le domaine neurologique, les DPSCs sont considérées comme une solution prometteuse dans le cadre de la thérapie cellulaire des désordres neurologiques (Martens *et al.* 2013), car elles sécrètent des facteurs neurotrophes et sont capables d'influencer le recrutement endogène de cellules souches neurales (Nosrat *et al.* 2001, Arthur *et al.* 2009). La transplantation de DPSCs dans divers modèles d'accidents ischémiques a amélioré le recouvrement des fonctions sensori-motrices, diminué le volume de tissus lésés, accéléré la néovascularisation de la zone ischémique et amélioré la régénération neuronale dans divers modèles animaux (Nakashima *et al.* 2009,

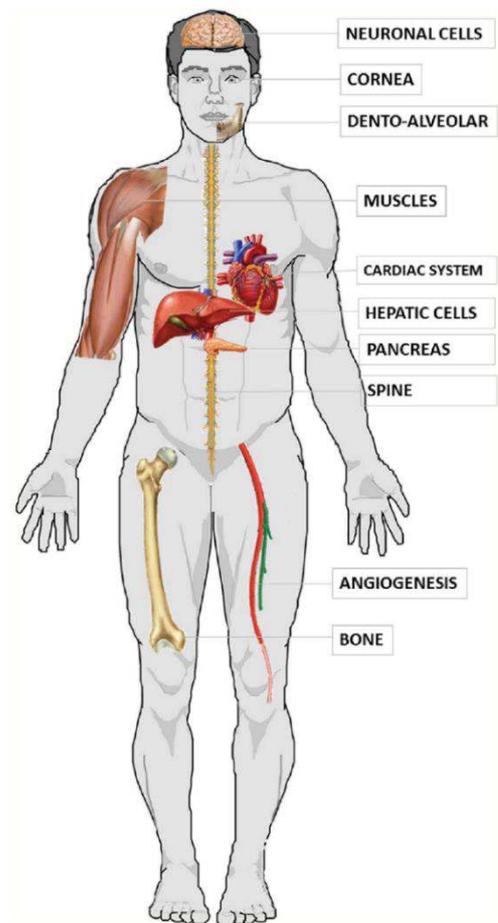


Figure 4 : Applications thérapeutiques potentielles des DPSCs (Chalisserry *et al.* 2017).

Sugiyama *et al.* 2011, Yang *et al.* 2012). Les DPSCs ont également montré leur utilité pour le traitement de lésions nerveuses de la moëlle épinière (Sasaki *et al.* 2011) et du système nerveux périphérique (Sakai *et al.* 2012), induites chez le rat. Enfin, les DPSCs ont une fonction neuroprotectrice dans des modèles *in vitro* de la maladie d'Alzheimer et celle de Parkinson (Nesti *et al.* 2011, Mita *et al.* 2015). Par conséquent, les DPSCs sont considérées comme des candidats potentiels pour des études sur la thérapie cellulaire des troubles neurodégénératifs ainsi que la prise en charge des accidents ischémiques et des lésions nerveuses centrales et périphériques.

Récemment des cellules souches issues de dents de sagesse extraites ont été différenciées en hépatocytes (Ikeda *et al.* 2008). Par la suite, des DPSCs ont été implantées avec de la mélatonine chez des souris présentant une lésion hépatique induite. En comparaison avec le groupe contrôle, ce traitement a empêché la fibrose hépatique et augmenté les taux d'albumine et de bilirubine (Cho *et al.* 2015). Ces résultats laissent espérer que la thérapie cellulaire utilisant des DPSCs puisse être utilisée comme une alternative à la transplantation hépatique dans le traitement des cirrhoses.

Les DPSCs ont également été utilisées dans des études sur le diabète. Plus précisément, l'utilisation de cellules souches différenciées pour reconstituer les cellules β des îlots de Langerhans a été proposée comme alternative à la thérapie conventionnelle à base d'insuline (Bhonde *et al.* 2014). En effet, lorsqu'elles sont soumises aux stimuli appropriés, les DPSCs peuvent se différencier en cellules pancréatiques ressemblant à des agrégats cellulaires du type îlot (Govindasamy *et al.* 2011, Carnevale *et al.* 2013). Dans une étude *in vivo*, des DPSCs différenciées en amas cellulaires semblables aux îlots de Langerhans ont permis la régulation de la glycémie de souris diabétiques (Kanafi *et al.* 2013). Ces observations soulignent l'intérêt thérapeutique potentiel des DPSCs autologues dans la thérapie cellulaire chez les patients diabétiques.

Les DPSCs sont aussi étudiées dans le traitement de la cécité cornéenne en raison de leur capacité à se différencier en kératinocytes *in vitro* (Mead *et al.* 2013, Syed-Picard *et al.* 2015). De plus, lorsqu'elles sont implantées au niveau des yeux de rats ou de souris, ces cellules ont la capacité de se différencier et d'exprimer des marqueurs propres aux kératinocytes, sans provoquer de rejet de greffe (Mead *et al.* 2013, Syed-Picard *et al.* 2015).

La capacité de différenciation ostéogénique des DPSCs a également été démontrée *in vitro* et *in vivo* (D'Aquino *et al.* 2007, Lindroos *et al.* 2008). Dans un modèle de défaut critique au niveau de la partie supérieure de l'enveloppe osseuse du crâne, la calvaria, chez le rat, l'implantation de DPSCs

dans une matrice d'os déprotéinisé d'origine bovine a amélioré le processus de régénération osseuse au niveau des défauts (Annibali *et al.* 2014). Dans un modèle similaire, l'implantation de DPSCs humainesensemencées dans des éponges de collagène a permis un comblement presque total du défaut contrairement au groupe contrôle où l'implantation de matrices de collagène sans cellule a engendré un comblement modéré des défauts (Maraldi *et al.* 2013). Des greffes de DPSCs autologues ensemencées sur des matrices adaptées dans des défauts mandibulaires chez le chien et chez l'humain ont également permis une régénération osseuse augmentée par rapport aux groupes contrôles (d'Aquino *et al.* 2009, Yamada *et al.* 2011). Ces observations ont montré que l'utilisation de DPSCs ensemencées dans des matrices adaptées a un intérêt thérapeutique pour la régénération osseuse (Graziano *et al.* 2008).

1.2.2.2 Matrices

Outre les cellules souches, l'ingénierie tissulaire nécessite l'utilisation de matrices permettant de soutenir une organisation tissulaire complexe. La matrice idéale doit promouvoir l'adhésion, la migration, la prolifération et l'organisation tridimensionnelle de la population cellulaire nécessaire au remplacement structurel et fonctionnel du tissu lésé. La biocompatibilité est un prérequis essentiel pour prévenir les réactions tissulaires indésirables. De plus, les matrices utilisées doivent présenter une vitesse de dégradation contrôlée, prévisible et reproductible en substances non toxiques, facilement métabolisées ou excrétées. Cette biodégradabilité doit permettre la croissance vasculaire et le remplacement de la matrice par les tissus appropriés. D'un point de vue technique, ces matrices doivent avoir la capacité d'incorporer des facteurs chimiques dirigeant et promouvant la croissance de nouveaux tissus et permettre un traitement facile en formes tridimensionnelles de tailles suffisantes pour combler les défauts cliniquement pertinents (Scheller *et al.* 2009, Galler *et al.* 2011, Hilkens *et al.* 2015). Dans le cadre de la régénération pulpaire, les matrices injectables, formant un gel *in situ*, sont particulièrement intéressantes car elles sont facilement formulées avec des facteurs de croissance et des cellules par simple mélange et peuvent se conformer au volume de la chambre pulpaire après injection (Lu *et al.* 2015).

De nombreuses matrices ont déjà été testées en ingénierie tissulaire dentaire, comme le collagène, la fibrine, l'acide hyaluronique, des polymères synthétiques (poly(acide lactique), poly(acide glycolique), poly(acide lactique-co-acide glycolique)), l'hydroxyapatite, le phosphate de calcium, des fragments de matrice dentinaire et des peptides auto-assemblables. Bien que certaines

aient permis la régénération d'un complexe pulpo-dentinaire *in vivo*, l'influence des propriétés mécaniques de ces matrices est longtemps restée inexploree.

Une caractéristique physique essentielle des matrices utilisées en ingénierie tissulaire est leur module d'élasticité également nommé module de Young. En effet, les organes ont des modules d'élasticité présentant différents ordres de grandeur, allant de 17 Pa dans les tissus adipeux à 950 kPa au niveau des cartilages articulaires (Levental *et al.* 2007). Dans le cas du complexe pulpo-dentinaire humain, le module de Young de la pulpe a été évalué à $5,5 \pm 2,8$ kPa (Ozcan *et al.* 2016) alors que celui de la dentine est de 17 GPa ou 42 GPa en fonction des zones étudiées (Ziskind *et al.* 2011). Des expériences *in vitro* montrent que l'adhésion cellulaire, la morphologie et le profil d'expression des gènes changent sur des surfaces chimiquement équivalentes présentant des rigidités différentes (Nemir et West 2010). Les études portant sur les MSCs montrent qu'elles migrent plus rapidement sur les substrats mous (Saxena *et al.* 2018) et qu'elles sont soumises au phénomène de durotaxie (Vincent *et al.* 2013), c'est-à-dire qu'elles migrent généralement depuis les substrats mous vers les substrats durs.

L'influence des propriétés mécaniques de matrices tri-dimensionnelles sur la différenciation des MSCs a récemment été évaluée dans le cadre de l'ingénierie tissulaire dentaire. Dans ce contexte, une étude portant sur les cellules stromales de la moelle osseuse (Bone marrow stromal cells : BMSCs) a montré que leur compression dans un hydrogel thermosensible, recouvert de collagène VI, entraîne une expression accrue des facteurs de transcription Pax9 et Msx1 qui signent l'induction de la différenciation odontogénique. Transposés *in vivo*, ces hydrogels maintiennent une compression des BMSCs et induisent leur différenciation en cellules odontoblastiques ainsi que la formation de tissus minéralisés similaires à la dentine, contrairement aux hydrogels témoins (Hashmi *et al.* 2017). Dans une étude similaire, des DPSCs ont étéensemencées dans des hydrogels de rigidités variables puis cultivées dans un milieu de différenciation odontogénique/ostéogénique pendant 3 semaines. Cette étude a montré que les DPSCs se différencient en cellules odontoblastiques dans les hydrogels les plus rigides et en d'autres lignées dans les matrices les plus molles (Lu *et al.* 2015). Une autre étude a développé ce concept en postulant qu'une matrice rigide entraîne la formation de dentine tandis qu'un substrat mou favorise la formation de tissu pulpaire à partir de DPSCs. Après avoir confirmé la formation de dentine à partir de DPSCsensemencées *in vitro* dans une matrice de gélatine nanofibreuse tridimensionnelle rigide et la formation de tissu pulpaire dans une matrice moins rigide, les chercheurs ont combiné ces deux matrices en un seul substrat. Après 4 semaines de culture *in vitro*, une matrice minérale a été observée sur la partie rigide du substrat tandis que les cellulesensemencées sur la partie molle exprimaient des marqueurs caractéristiques des tissus pulpaire (Qu *et al.* 2015). Implanté *in vivo* chez la souris, ce modèle permet la génération d'un complexe pulpo-dentinaire (Qu *et al.* 2015).

1.2.2.3 Facteurs solubles

En plus des signaux mécaniques décrits ci-dessus, le comportement des DPSCs peut être modulé par les facteurs solubles libérés par la déminéralisation de la dentine ou par des matrices synthétiques ou sécrétés par des cellules, dont les DPSCs elles-mêmes (Rombouts *et al.* 2016, Duncan *et al.* 2018). Ils peuvent également être dérivés du caillot sanguin formé lors de certaines procédures de revascularisation. L'intégration de ces signaux dans les matrices utilisées en ingénierie tissulaire peut permettre la régulation précise de la fonction cellulaire et de la formation des tissus.

La libération des facteurs solubles contenus dans la dentine peut être provoquée par une carie ou par les procédures de mise en forme endodontique (Galler et Widbiller 2017, Duncan *et al.* 2018). Ces facteurs peuvent alors être collectés puis injectés dans des matrices synthétiques (Galler et Widbiller 2017). C'est notamment le cas du facteur de croissance transformant bêta (transforming growth factor- β : TGF- β), le facteur de croissance des fibroblastes basique (basic fibroblast growth factor : bFGF), le facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (vascular endothelial growth factor : VEGF), les protéines osseuses morphogénétiques (bone morphogenetic proteins : BMPs) et le facteur de croissance dérivé des plaquettes (platelet-derived growth factor : PDGF) (Galler *et al.* 2014). Certains types cellulaires, comme les fibroblastes pulpaire, peuvent produire des facteurs de croissances tels que le bFGF, le VEGF et le PDGF (Duncan *et al.* 2018). Les DPSC ont également un effet paracrine et sécrètent de nombreux facteurs solubles dont le VEGF et le facteur de croissance nerveuse (nerve growth factor : NGF) (Duncan *et al.* 2018).

De nombreux facteurs de croissance ont été testés sur les DPSCs. Le facteur-1 dérivé des cellules stromales (Stromal cell-derived factor : SDF-1), le bFGF et le PDGF sont des molécules chimiotactiques. Le SDF-1 et le bFGF promeuvent la migration et la prolifération des DPSCs et limitent leur différenciation (He *et al.* 2008, Kim *et al.* 2013,). Il est intéressant de noter que l'effet inhibiteur du bFGF sur la différenciation DPSCs est réversible (He *et al.* 2008). Inversement, le TGF β 1 limite la prolifération des DPSCs tandis que la BMP-7 induit leur différenciation ostéogénique et limite leur migration (Kim *et al.* 2010, Duncan *et al.* 2018). Le VEGF et le PDGF sont des facteurs proangiogéniques qui augmentent la densité vasculaire des tissus pulpaire néoformés et modulent la minéralisation des DPSCs (Gong *et al.* 2016). Enfin, le NGF a été utilisé pour son rôle dans la promotion de la croissance et de la survie des fibres nerveuses (Kim *et al.* 2010).

Le facteur de croissance commercial utilisé pour les premiers essais cliniques de régénération pulpaire chez l'homme est le G-CSF. Il agit sur la migration des cellules souches de manière similaire au SDF-1 et améliore la régénération pulpaire grâce à son effet anti-apoptotique (Iohara *et al.* 2013, Nakashima *et al.* 2017).

1.2.3 Transplantation cellulaire et cell-homing

Actuellement, deux stratégies sont étudiées pour permettre la régénération complète de la pulpe dentaire : la transplantation cellulaire et le cell homing (Figure 5). La transplantation cellulaire consiste à injecter les cellules souches autologues et des facteurs de croissance insérés dans une matrice dans la dent lésée. A l'inverse, l'objectif du cell-homing est le recrutement de cellules souches résiduelles résidant à proximité des tissus à régénérer. Dans cette stratégie, une matrice imprégnée de facteurs de croissance est injectée dans l'espace endodontique pour induire la migration, la prolifération et la différenciation des cellules souches endogènes résidant dans les tissus pulpaire résiduels ou autour de l'apex dentaire (Galler et Widbiller 2017). Dans les deux stratégies, les facteurs de croissance libérés provoquent un envahissement vasculaire et une excroissance neuronale des tissus périapicaux dans l'espace endodontique.

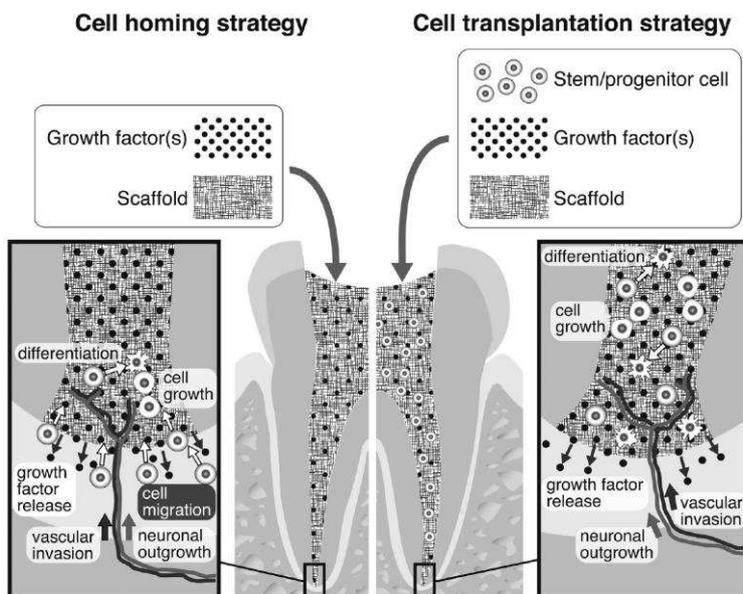


Figure 5 : Deux stratégies de régénération pulpaire de la dent permanente mature non vitale. Dans la stratégie du cell-homing, les facteurs de croissance et la matrice sont implantés dans l'espace endodontique. La libération des facteurs de croissance entraîne la migration des cellules souches de l'espace desmodontal vers l'espace canalaire. Dans le cadre de l'autotransplantation cellulaire, des cellules souches et les facteurs de croissance inclus des matrices sont injectés dans l'espace endodontique (Marotomi et al. 2009).

1.2.3.1 Transplantation cellulaire

Les procédures de transplantation cellulaire ont été mises en application sur des modèles animaux, en particulier le chien. La première publication à ce sujet rapporte la transplantation de cellules souches pulpaire autologues dans des dents présentant des lésions pulpaire induites (Iohara *et al.* 2009). Brièvement, une sous-population de cellules souches pulpaire était isolée et mise en culture jusqu'au 4^{ème} passage, puisensemencée dans une matrice destinée à être réimplantée. Après 24 h de culture en incubateur, un chien était anesthésié et des pulpotomies étaient réalisées sur plusieurs de ses dents. La matrice et les cellules souches étaient alors réimplantées dans les dents lésées puis la cavité d'accès était scellée hermétiquement. Après deux semaines de culture, les dents étaient extraites et soumises à des analyses morphologiques et histologiques. Les dentsensemencées avec les cellules souches pulpaire ont montré la formation d'un tissu pulpaire vascularisé ainsi qu'une apposition de dentine le long des parois canalaire (Iohara *et al.* 2009). Deux ans plus tard, la même équipe a montré dans une étude *ex vivo* que la régénération d'un tissu pulpaire sur toute la longueur d'une racine, dont l'apex avait été élargi à 0,8 mm, était possible en 2 semaines de culture *ex vivo* (Nakashima et Iohara 2011).

Dans des études subséquentes, les tissus pulpaire d'incisives de chien étaient extirpés et remplacés par une matrice (collagène I et III ou éponge de gélatine) contenant des cellules souches dentaire autologues avec ou sans SDF-1 (Iohara *et al.* 2011, Wang *et al.* 2013). Ces études ont prouvé qu'il était possible de régénérer un tissu pulpaire vascularisé et innervé, capable de synthétiser de la dentine après une greffe de DPSCs. Deux études ont ensuite validé l'innocuité, la faisabilité et l'efficacité de la régénération pulpaire par une sous-population de DPSCs injectée avec du G-CSF chez le chien. Ces études ont conclu que la normalisation ainsi que l'établissement de lignes directrices réglementaire pour la régénération tissulaire en endodontie est devenue une réalité (Iohara *et al.* 2013, Nakashima et Iohara 2014). Récemment, un essai clinique a porté sur la régénération pulpaire en transplantant une sous-population de DPSCs autologues chez 5 patients atteints de pulpites irréversible. Cette étude, présentant un suivi clinique de 32 semaines, a montré qu'il était possible de restaurer un tissu intracanalair semblable aux tissus sains et présentant une sensibilité pulpaire normale, sur 3 des 5 patients traités. De plus, les évaluations menées en clinique et au laboratoire n'ont révélé aucun effet indésirable ni aucune toxicité. Cette étude pilote concluait que l'autotransplantation de DPSCs humaine est une technique sûre et efficace pour la régénération complète de la pulpe chez l'humain (Nakashima *et al.* 2017). D'autres essais clinique randomisés incluant plus de patients sont néanmoins nécessaires avant d'espérer généraliser cette technique.

Malgré les résultats obtenus, la transplantation de DPSCs soulève plusieurs problèmes non résolus. Premièrement, la prolifération bactérienne dans l'espace canalaire entre l'extirpation de la pulpe inflammée et la réimplantation des cellules après la phase de culture au laboratoire peut entraîner l'échec de la transplantation cellulaire par contamination (Nakashima *et al.* 2017). Bien que la mise en place de médications intracanales ait été proposée pour empêcher la prolifération bactérienne entre la mise en forme canalaire et l'obturation, il n'existe aucune solution complètement efficace. De plus, la création d'une banque de cellules autologues, leur stockage, leur expansion et leur caractérisation sont hors de portée d'un chirurgien-dentiste exerçant dans un cabinet. Enfin, les cellules humaines utilisées à des fins médicales doivent respecter les bonnes pratiques de fabrication, rendant cette approche fastidieuse et coûteuse.

Dans la mesure où les pathologies pulpaires n'engagent pas le pronostic vital et que le taux de succès du traitement endodontique est relativement élevé, il est peu probable que les techniques d'autotransplantation cellulaire aient un jour leur place au cabinet dentaire.

1.2.4 Cell homing

En raison des obstacles susmentionnés, la stratégie du cell-homing, qui repose sur le recrutement de cellules souches résidentes par des matrices et des facteurs de croissance adaptés, a été proposée.

La première étude rapportant la régénération d'un tissu ressemblant à de la pulpe dentaire par cell homing a été publiée en 2010. Cette étude rapporte la réimplantation d'incisives et canines humaines extraites, puis remplies d'une matrice de collagène enrichie en facteurs de croissance chez des souris immunodéprimées. Cette procédure a généré des tissus cellulaires vascularisés et innervés ainsi qu'une formation apparente de dentine à la surface des parois dentinaires de certaines dents. Le tissu pulpaire dentaire néoformé était dense et comprenait des cellules odontoblastiques entourées d'une matrice extra-cellulaire (MEC). Cette étude a été la première à montrer que des facteurs de croissance injectés dans le canal peuvent guider la migration, la prolifération et la différenciation de cellules endogènes pour constituer un tissu pulpaire (Kim *et al.* 2010).

Récemment, une procédure de cell homing, appelée revascularisation endodontique, a été décrite par la société européenne d'endodontie (Galler *et al.* 2016). Cette approche a pour but de régénérer le tissu pulpaire nécrosé de dents immatures en induisant un afflux de SCAPs dans l'espace canalaire. Cette revascularisation peut induire une reprise de l'édification radiculaire même après une nécrose pulpaire (Hargreaves *et al.* 2013). Cette procédure comporte trois étapes : la désinfection de l'espace endodontique à l'aide d'irrigants, l'application d'une médication intracanaire avec des propriétés antiseptiques et anti-inflammatoires pendant 2 semaines, puis l'induction d'un saignement dans le canal, entraînant la formation d'un caillot sanguin. Bien que des cas de revascularisation pulpaire aient été décrits, cette technique reste controversée, notamment parce que les analyses histologiques des tissus formés ne révèlent pas systématiquement des tissus pulpaires fonctionnels (Galler *et al.* 2016). De plus, cette technique ne s'applique qu'aux dents immatures présentant encore des SCAPs. Actuellement d'autres études et protocoles ont été proposés pour permettre la régénération de la pulpe au travers du recrutement de DPSCs, dans les cas de lésion partielle de la pulpe, ou de PDLSCs dans les cas d'élimination complète du tissu pulpaire (Galler et Widbiller 2017).

En résumé, la régénération pulpaire pourrait répondre aux problèmes de santé publique soulevés par l'infection endodontique grâce à l'autotransplantation cellulaire ou le cell homing. Bien que différentes par certains aspects, ces deux techniques utilisent des matrices permettant la survie, la migration ainsi que la différenciation des DPSCs et qui doivent être injectées dans un milieu décontaminé. Le niveau de désinfection nécessaire est probablement plus élevé que celui accepté pour les traitements endodontiques, pour lesquelles la simple réduction de la charge bactérienne suivie de l'obturation de l'espace endodontique sont propices à la guérison (Fouad 2011). Lors des techniques de régénération pulpaire, les pathogènes endodontiques peuvent recoloniser l'espace canalaire pendant la phase d'expansion et de caractérisation des cellules prélevées. Il est donc important d'identifier des agents antimicrobiens efficaces pour désinfecter l'espace pulpaire et éviter sa recontamination lors des thérapies de régénération pulpaire. Cet aspect sera développé dans le quatrième chapitre de ce travail.

Actuellement, de nombreuses études cliniques ont montré la faisabilité de la régénération tissulaire pulpaire sur des modèles animaux et sur des patients humains. La minéralisation, la vascularisation et l'innervation des tissus néoformés ont été au centre de l'attention des chercheurs alors que la migration des DPSCs, pourtant indispensable à la fonction pulpaire native ou régénérée, a été peu étudiée à ce jour. L'étude de ce phénomène cellulaire est justement l'objet de ce travail de thèse. Dans le prochain chapitre, nous nous attacherons à rappeler le fonctionnement de ce processus cellulaire fondamental.

Chapitre 2. Migration et mécanotransduction

2.1	Migration	39
2.1.1	Acteurs de la migration.....	39
2.1.2	Mécanismes de migration.....	44
2.1.3	Inhibition du cytosquelette d'actine.....	46
2.2	Mécanotransduction	48
2.2.1	Rôle de YAP/TAZ dans la mécanotransduction.....	49
2.2.2	Mécanismes de régulation de l'activité de YAP/TAZ.....	51
2.2.3	Entrée de YAP/TAZ dans le noyau.....	56
2.3	Chromatine	57
2.3.1	Structure de la chromatine.....	57
2.3.2	Euchromatine et hétérochromatine.....	59
2.3.3	Lien entre condensation de la chromatine et rigidité du substrat.....	61
2.3.4	Condensation de la chromatine et distribution nucléocytoplasmique de YAP/TAZ.....	62

2.1 Migration

La migration cellulaire est un processus incontournable de la vie cellulaire qui nécessite l'activité coordonnée de trois systèmes de filaments ainsi qu'un large éventail de protéines interagissant avec le cytosquelette, en particulier les moteurs protéiques. La migration est essentielle pour tous les organismes au cours de plusieurs événements comme le développement embryonnaire, la cicatrisation, le recrutement des cellules immunitaires et l'entretien des tissus. Dans le cas des DPSCs, qui demeurent quiescentes à l'état physiologique, leur activation est provoquée par la déminéralisation de la dentine et l'inflammation pulpaire provoquées par une agression externe. Les DPSCs prolifèrent alors puis migrent au contact de la dentine avant de se différencier en cellules odontoblastiques, sécrétant de la dentine réparatrice. Ainsi, la migration des DPSCs est un mécanisme essentiel pour le maintien de la vitalité ainsi que pour la régénération pulpaire. La compréhension des mécanismes qui sous-tendent la régénération pulpaire nécessite donc la connaissance des mécanismes fondamentaux de la migration cellulaire.

Dans ce chapitre, je présenterai d'abord les différents acteurs de la migration cellulaire puis je décrirai les étapes du cycle de migration d'une cellule sur une surface bidimensionnelle.

2.1.1 Acteurs de la migration

2.1.1.1 Cytosquelette d'actine

Le cytosquelette d'actine joue un rôle fondamental dans divers processus cellulaires tels que la migration, la morphogenèse, la cytokinèse, l'endocytose et la phagocytose (Heissler et Manstein 2013). Sa fonction principale est la génération des forces qui sous-tendent les processus cellulaires mentionnés ci-dessus. Cette fonction est remplie par deux mécanismes distincts : la polymérisation coordonnée de filaments d'actine et la formation de structures contractiles (Tojkander *et al.* 2012).

Concernant la polymérisation coordonnée de filaments d'actine, le cytosquelette d'actine est formé de sous-unités globulaires (actine-G) qui, après une étape de nucléation, s'assemblent en hélice droite pour former des filaments d'actine (actine-F). Ces filaments sont polarisés et présentent une extrémité "plus" à croissance rapide et une extrémité "moins" à croissance lente (Pollard et Cooper 2009). A l'équilibre, les filaments d'actine subissent un assemblage à l'extrémité "plus" et un

désassemblage à l'extrémité "moins". Ils gardent donc une longueur constante, bien qu'il y ait un flux de monomères le long du filament. Des protéines se fixant à l'actine peuvent moduler la dynamique et l'organisation des filaments en contrôlant la nucléation, l'allongement et la dépolymérisation, permettant ainsi un remodelage permanent du cytosquelette d'actine en fonction des besoins cellulaires (Pollard 2016).

Parmi les protéines contrôlant la dynamique de l'actine, les formines et l'actin related protein 2-3 complexe (Complexe Arp2/3) permettent de catalyser et de contrôler la nucléation. Ainsi les formines, capables de nucléer des filaments droits non ramifiés, semblent être à l'origine des filopodes (Figure 1). Ces fines protrusions retrouvées sur le front de migration des cellules (Faix et Rottner 2006) ont pour rôle la détection de l'environnement et la transduction du signal au travers des intégrines (Galbraith *et al.* 2007, Mattila et Lappalainen 2008). A l'inverse, le complexe Arp2/3 effectue la nucléation des filaments d'actine à partir de leur extrémité "moins", tout en se fixant sur un autre filament d'actine (Mullins *et al.* 1998). Le complexe Arp2/3 favorise ainsi la formation de protrusions aplaties appelées lamellipodes qui propulsent le front de migration des cellules et sondent les propriétés chimiques et mécaniques du substrat (Figure 1). Dans les filopodes comme dans les lamellipodes, l'extrémité "plus" des filaments d'actine est dirigée vers le front de migration de la cellule (Small et al. 1978). Cette organisation provoque un effet de « tapis roulant » sur l'ensemble des filaments qui s'assemblent à l'avant du front de migration et se dépolymérisent soit sur tout le corps du lamellipode soit à la base du filopode (Pollard et Borisy 2003).

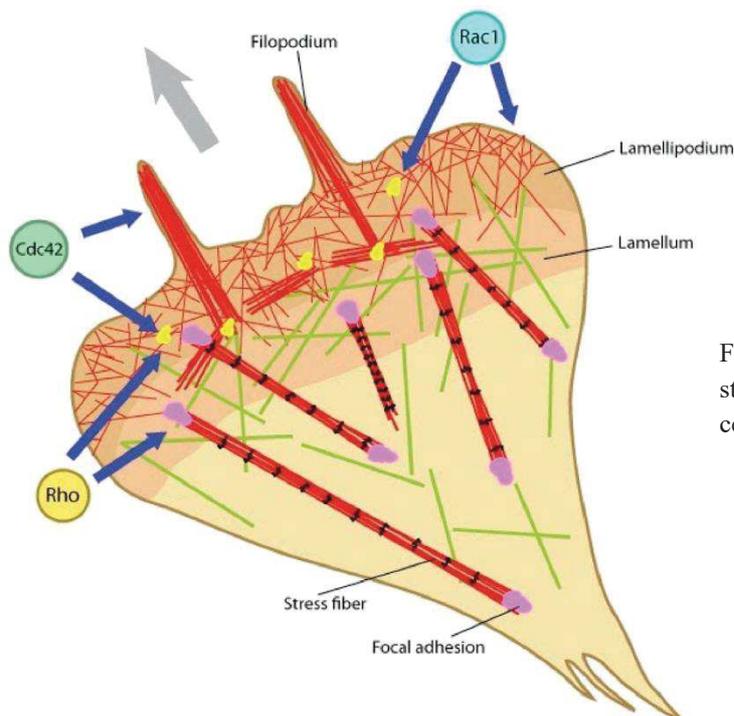


Figure 1 : Organisation des différentes structures du cytosquelette d'actine dans une cellule adhérente (Ladoux et Nicolas. 2012).

Parmi les protéines modulant la polymérisation et la dépolymérisation des filaments d'actine les GTPases de la famille Rho jouent un rôle essentiel dans la dynamique des filaments d'actine (Sit et Manser 2011). Chez l'humain il existe une vingtaine de Rho GTPases, dont RhoA (Ras homolog family member A), Rac et Cdc42 restent les plus étudiées. Rho stimule l'assemblage des fibres de stress par l'activation d'effecteurs tels que ROCK (Rho-associated protein kinase) et la mDia1/2 (Diaphanous-related formin-1/2), tandis que Rac (Ras-related C3 botulinum toxin substrate) et Cdc42 (Cell division control protein 42 homolog) favorisent la formation de réseaux de filaments d'actine, entraînant respectivement des extensions de lamellipodes et filopodes (Amano *et al.* 2010). Une fois les filaments d'actine formés, ils peuvent être stabilisés par coiffage de leurs extrémités "plus" et "moins" par des protéines telles que la CapZ et la tropomoduline. Enfin, le désassemblage des filaments d'actine est également modulé par des protéines telles que la gelsoline et la cofiline, qui provoquent la rupture ou la dépolymérisation des filaments d'actine.

2.1.1.2 Actomyosine

Une caractéristique essentielle du cytosquelette d'actine est sa capacité à former des structures contractiles grâce à l'action de la myosine (Syamaladevi *et al.* 2012). Les assemblages entre l'actine et la myosine jouent un rôle important dans la contraction musculaire, le maintien de l'architecture cellulaire, la division cellulaire et la migration (Heissler et Manstein 2013).

Parmi les myosines, la myosine du muscle squelettique, appelée myosine II, est particulièrement étudiée pour son rôle dans la contraction cellulaire. Cette dernière est constituée de deux chaînes lourdes composées d'une tête, d'un col où viennent se fixer deux paires de chaînes légères et d'une longue queue qui permet l'assemblage de plusieurs molécules de myosine en faisceaux bipolaires (Figure 2). Les têtes de myosine ont deux domaines fonctionnels, l'un liant l'adénosine triphosphate (ATP), l'autre se fixant aux filaments d'actine. L'assemblage des filaments d'actine et de myosine II forment des structures contractiles dont la fonction est assurée par l'hydrolyse de l'ATP par les têtes de myosine, provoquant le glissement des filaments d'actine auxquelles elles sont rattachées (Sweeney et Holzbaur 2018). L'activation de la myosine est contrôlée par la protéine ROCK qui provoque la phosphorylation des chaînes légères de myosine (Schoenwaelder et Burridge 1999).

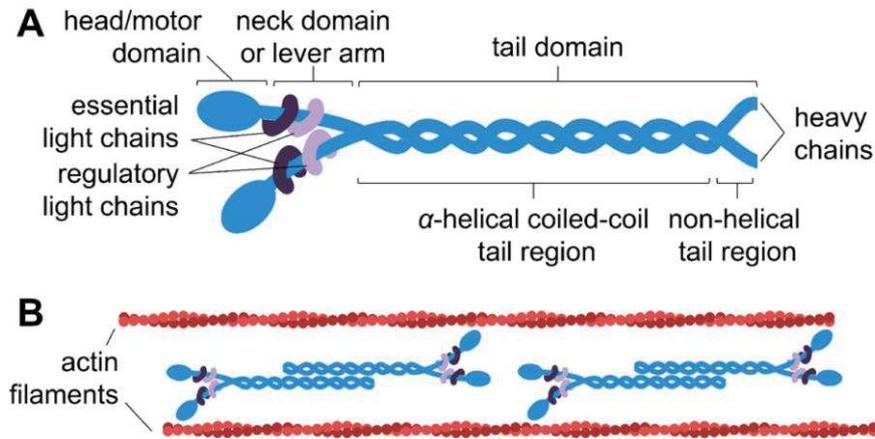


Figure 2 : (a) Structure de la myosine II, composée de deux chaînes lourdes, deux chaînes légères essentielles et deux chaînes légères régulatrices. (b) Association de la myosine II en filaments et connexion aux filaments d'actine (Roman *et al.* 2018).

Les complexes d'actomyosine peuvent s'organiser en fibres de stress qui elles-mêmes peuvent s'ancrer aux adhésions focales qui relient la MEC au cytosquelette d'actine (Pellegrin et Mellor 2007) (Figure 1). Néanmoins, la morphologie et l'association des fibres de stress aux adhésomes peuvent varier en fonction de leur localisation intracellulaire. Des variations existent aussi entre différents types cellulaires : les fibres de stress sont généralement épaisses et stables dans les cellules qui migrent peu alors qu'elles sont plus minces et dynamiques dans les cellules très mobiles (Pellegrin et Mellor 2007).

2.1.1.3 Le complexe adhésome

L'adhésion des cellules à la MEC est médiée par des régions spécialisées de la membrane plasmique appelées adhésome, adhésions focales ou contacts focaux. Les adhésions focales sont des adhésomes matures étendus, principalement situés à l'extrémité des fibres de stress, alors que les complexes focaux sont de petites zones d'adhésion que l'on trouve à l'extrémité des filopodes et lamellipodes. Au niveau de ces sites, les fibres de stress sont ancrées aux récepteurs transmembranaires de la famille des intégrines par l'intermédiaire d'un complexe multiprotéique. Ce dernier est composé de nombreuses protéines parmi lesquelles les protéines adaptatrices comme la taline, la vinculine, la tensine et la paxilline renforcent la connexion entre les intégrines et l'actine (del Rio *et al.* 2009). Ce complexe inclut aussi des protéines de signalisation dont les focal adhesion kinases (FAKs) qui se lient à la tensine ou à la paxilline et permettent notamment de contrôler la polymérisation de l'actine (Serrels *et al.* 2007).

Les intégrines sont les principaux composants des adhésomes. Elles forment une grande famille de récepteurs de glycoprotéines transmembranaires hétérodimériques $\alpha\beta$ impliquée dans l'adhésion aux composants de la MEC ainsi que dans certains contacts intercellulaires. La littérature actuelle fait état de dix-huit sous-unités α et huit sous-unités β pouvant se combiner pour former 24 récepteurs d'adhésion connus (Anderson *et al.* 2014) (Figure 3). Les sous-unités α et β sont deux récepteurs transmembranaires liés de façon non covalente et présentant un grand domaine extracellulaire au contact de la MEC (extrémité N-terminale), un domaine transmembranaire et un court domaine cytoplasmique (exterminé C-terminale). Les domaines extracellulaires des intégrines se lient à des séquences spécifiques présents dans la fibronectine, le collagène, la laminine et d'autres protéines de la MEC. Cette liaison induit un changement conformationnel révélant les domaines cytoplasmiques des intégrines, ce qui favorise leur liaison au cytosquelette d'actine, en particulier les fibres de stress, par le biais de complexes multiprotéiques (Hynes 2002, Geiger *et al.* 2009, Parsons *et al.* 2010) (Figure 4). Ce mécanisme permet aux intégrines de transmettre des signaux externes vers le noyau cellulaire, via les composants des adhésomes. Elles jouent ainsi un rôle majeur dans l'adhésion focale, la mécanotransduction, la migration et la division cellulaire (Vicente-Manzanares *et al.* 2009).

La liaison intégrine-actine est médiée par plusieurs protéines, dont certaines se lient directement à l'actine. Parmi ces protéines de liaison, la vinculine a été ciblée dans ce travail pour visualiser la taille et la répartition des adhésomes.

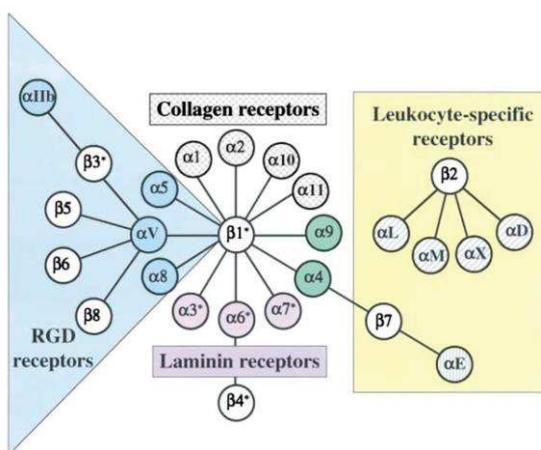


Figure 3 : Famille des intégrines (Hynes 2002).

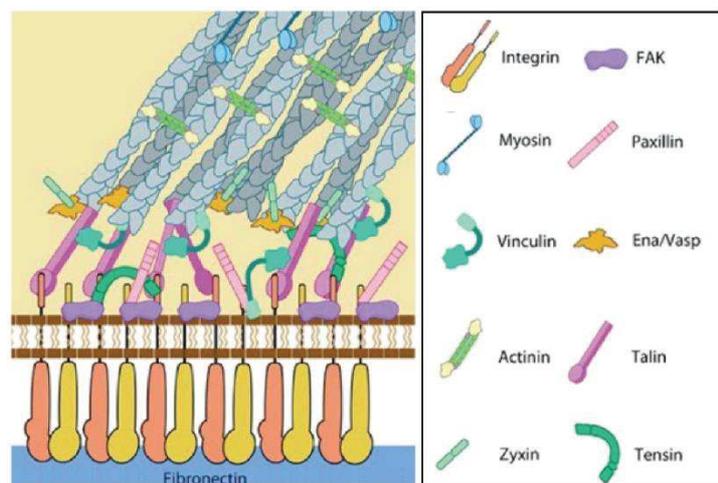


Figure 4 : Structure protéique (non exhaustive) d'un adhésome (Ladoux et Nicolas 2012).

2.1.2 Mécanismes de migration

La migration cellulaire est un processus complexe qui dépend entre autres du cytosquelette d'actine. Elle implique trois étapes distinctes : la protrusion, l'adhérence et la traction (Figure 5).

La protrusion du front de migration repose sur les forces engendrées par la polymérisation des filaments d'actine, entraînant une avancée de la membrane plasmique sous forme de lamellipodes ou de filopodes, par exemple, et un flux rétrograde des filaments d'actine (Lauffenburger et Horwitz 1996, Ananthakrishnan et Ehrlicher 2007, Gagliardi *et al.* 2015) (Figure 5a).

Dans une seconde étape, les protrusions membranaires adhèrent à la MEC au travers de complexes focaux localisés au niveau du front de migration (Figure 5b). Le couplage entre les protrusions et la MEC semble régulé par plusieurs mécanismes, dont le recrutement du complexe Arp2/3 par la vinculine (Demali *et al.* 2002). Ces complexes focaux empêchent le flux rétrograde des filaments d'actine, favorisant ainsi l'avancée du front de migration par la polymérisation de l'actine au contact de la membrane cellulaire (Figure 5b) (Lauffenburger et Horwitz 1996, Ananthakrishnan et Ehrlicher 2007, Gagliardi *et al.* 2015). Les complexes focaux se forment préférentiellement au niveau du front de migration, évoluent en adhésions focales dans le lamellipode et persistent jusqu'à atteindre l'arrière de la cellule (Gupton et Waterman-Storer 2006).

Dans une troisième étape, la contraction des fibres de stress générée par la myosine II le long des filaments d'actine permet au corps cellulaire de se propulser en avant en s'appuyant sur les contacts focaux préalablement formés (Lauffenburger et Horwitz 1996, Ananthakrishnan et Ehrlicher 2007). Comme les filaments et faisceaux d'actine sont reliés à la membrane cellulaire et au substrat, la force générée peut être convertie en forces de traction qui permettent l'avancée cellulaire (Figure 5c). Les forces d'adhésion sont donc un acteur essentiel du mouvement cellulaire, permettant la protrusion du front de migration et la translocation du corps cellulaire.

La perte d'adhésion à l'arrière de la cellule est un processus biochimique essentiel à la migration cellulaire (Gupton et Waterman-Storer 2006). (Figure 5d). Ce processus semble à la fois médié par des protéines régulatrices et par les forces contractiles cytosquelettiques développées à l'arrière de la cellule. En effet, lorsque les complexes focaux atteignent l'arrière de la cellule, ils sont soumis à des tensions considérables et finissent par se détacher (Ananthakrishnan et Ehrlicher 2007).

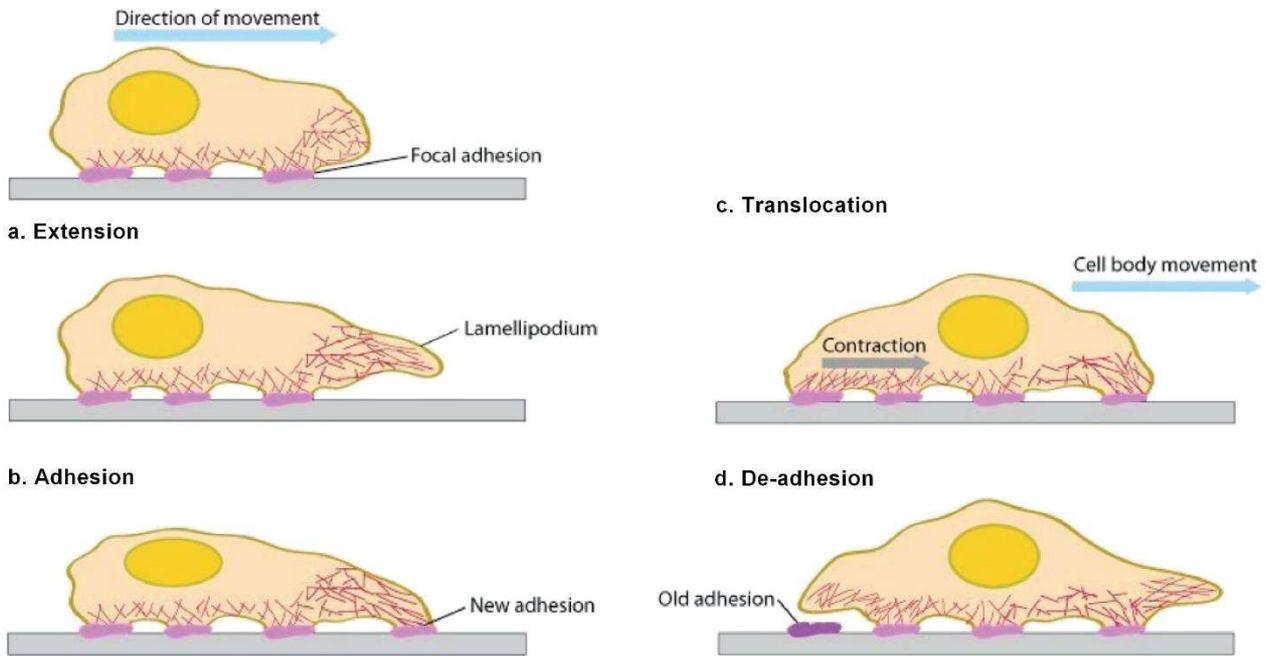


Figure 5 : Etapes de la migration cellulaire bidimensionnelle. (a) Polymérisation des filaments d'actine au niveau du front de migration. (b) Liaison des récepteurs de surface aux composants du substrat. (c) L'activité combinée du mouvement rétrograde de l'actine et des forces contractiles produites par les fibres de stress génère une tension qui tire le corps cellulaire vers l'avant. (d) Rétraction de l'arrière de la cellule (Ladoux et Nicolas 2012).

Les processus qui contribuent à la migration sont donc strictement régulés dans l'espace et le temps : la polymérisation de l'actine, les adhésions dynamiques et la contraction de la myosine II doivent être coordonnées pour que la cellule se déplace. La myosine II permet la connexion du cytosquelette aux protéines de la MEC grâce aux intégrines. Les forces générées à la fois par la polymérisation de l'actine et l'activité de la myosine II créent des tensions mécaniques au niveau des complexes focaux, induisant leur maturation en adhésions focales. La myosine II est également à l'origine des contractions qui permettent l'avancée du corps cellulaire et de la perte des adhésions focales à l'arrière de la cellule (Gupton et Waterman-Storer 2006).

Les cellules en migration exercent une force de traction significative sur le support, pouvant entraîner des déformations visibles (Harris *et al.* 1980) (Figure 6). Réciproquement, une cellule sur laquelle on applique une tension mécanique ou étirement externe développera des fibres de stress et des contacts focaux, et deviendra plus contractile.

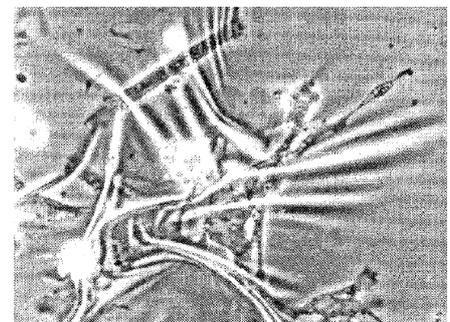


Figure 6 : Rides générées par des fibroblastes en migration sur une matrice en silicone (Harris *et al.* 1980).

2.1.3 Inhibition du cytosquelette d'actine

Les composés chimiques qui stabilisent ou déstabilisent la dynamique du cytosquelette d'actine sont des outils importants dans l'étude de sa fonction. De nombreuses drogues ont été décrites pour inhiber certains aspects de la dynamique du cytosquelette d'actine. Dans cette thèse, nous avons utilisé la blebbistatine, Y27632, CK666 et la latrunculine A.

2.1.3.1 Blebbistatine

La blebbistatine est une petite molécule qui a un effet inhibiteur sur la myosine II (Straight *et al.* 2003). Sa sélectivité ainsi que sa forte affinité pour la myosine II font de la blebbistatine un outil intéressant pour l'étude de l'impact de la myosine dans la migration cellulaire et la physiologie musculaire (Kovács *et al.* 2004). La blebbistatine interfère avec l'ATPase des têtes de myosine II, bloquant ainsi la myosine à l'état détaché de l'actine (Kovács *et al.* 2004). La blebbistatine a été décrite comme modifiant la morphologie et la fonction cellulaires. En présence de 50 μ M de blebbistatine, les cellules hépatiques sont plus petites, acquièrent une morphologie dendritique et montrent moins de fibres de stress ainsi que d'adhésions focales. De plus, la blebbistatine empêche la formation de rides à la surface du silicone sur lequel sontensemencées les cellules. Enfin, elle semble provoquer une augmentation de la vitesse moyenne de migration cellulaire dans le cadre de la migration bidimensionnelle (Liu *et al.* 2010, Pathak et Kumar 2012).

2.1.3.2 Y27632

Le dérivé de pyridine Y27632, [(+)-(R)-trans-4-(1-aminoéthyl)-N-(4-pyridyl)cyclohexane-carboxamide dihydrochloride] est un inhibiteur hautement spécifique de ROCK (Uehata *et al.* 1997). ROCK est une kinase qui peut stimuler la myosine en entraînant une phosphorylation de ses chaînes légères au travers de l'inhibition de la myosine light chain phosphatase (Schoenwaelder et Burridge 1999). La phosphorylation de la myosine ainsi induite entraîne une augmentation de son activité. De plus, ROCK active directement la myosine en phosphorylant ses chaînes légères régulatrices. L'augmentation de la quantité de chaînes de myosine phosphorylées qui résulte de l'activité de ROCK

augmente l'activité contractile de la myosine, ainsi que la formation de structures dépendantes de la tension mécanique, comme les fibres de stress (Schoenwaelder et Burridge 1999). En inhibant ROCK, Y27632 supprime la formation de fibres de stress et diminue la contractilité cellulaire liée à la myosine (Uehata *et al.* 1997, Peh *et al.* 2015).

2.1.3.3 CK666

CK636 et CK548 sont deux classes distinctes de petites molécules inhibitrices du complexe Arp2/3 qui bloquent la nucléation des filaments d'actine par ce dernier *in vitro* (Nolen *et al.* 2009). Ces molécules fournissent une méthode d'inhibition simple, rapide et réversible, permettant d'étudier le rôle du complexe Arp2/3 dans le processus de remodelage de l'actine. CK666 est une version plus puissante des composés parents CK636 et CK548 qui fonctionne comme un effecteur allostérique classique, stabilisant l'état inactif du complexe Arp2/3 en se liant à l'interface des monomères Arp2 et Arp3 dans leur conformation inactive (Hetrick *et al.* 2013). L'inhibition du complexe Arp2/3 par CK666 entraîne une transformation des lamellipodes en filopodes et induit une nouvelle organisation structurelle de l'actine pendant l'étalement cellulaire (Henson *et al.* 2015).

2.1.3.4 Latrunculine A

La latrunculine A est une molécule capable de perturber rapidement le cytosquelette d'actine, de façon réversible et spécifique (Spector *et al.* 1983). La latrunculine agit en se liant aux monomères d'actine et empêche leur assemblage, inhibant ainsi la polymérisation des filaments d'actine (Coué *et al.* 1987).

2.2 Mécanotransduction

La survie, la prolifération, la migration et la différenciation cellulaires dépendent de la capacité des cellules à percevoir les caractéristiques physiques de leur environnement et à s'y adapter de façon appropriée. La mécanodétection est le processus au cours duquel les cellules détectent les propriétés physiques de la MEC, telles que la rigidité de la matrice, pour moduler diverses fonctions cellulaires comme l'adhésion, la migration et la différenciation (Engler *et al.* 2006). La mécanotransduction utilise principalement une voie mécanique et une voie chimique. La voie de signalisation mécanique s'appuie sur le cytosquelette qui relie la MEC à la chromatine au travers de structures complexes détaillées dans les chapitres suivants. Les variations des propriétés physiques de l'environnement peuvent donc être directement transmises au noyau via le cytosquelette d'actine. Les mêmes forces mécaniques peuvent par ailleurs déclencher des voies de signalisation intracellulaires aboutissant à l'entrée de facteurs de transcription dans le noyau (Kassianidou *et al.* 2019) (Figure 7). Ces voies de signalisation complexes se croisent et se modifient mutuellement pour produire des réponses cellulaires adaptées. La rétroaction continue entre la détection des signaux mécaniques et leur transduction en signaux biochimiques régule la forme des cellules et des tissus et, finalement, la forme de l'organisme.

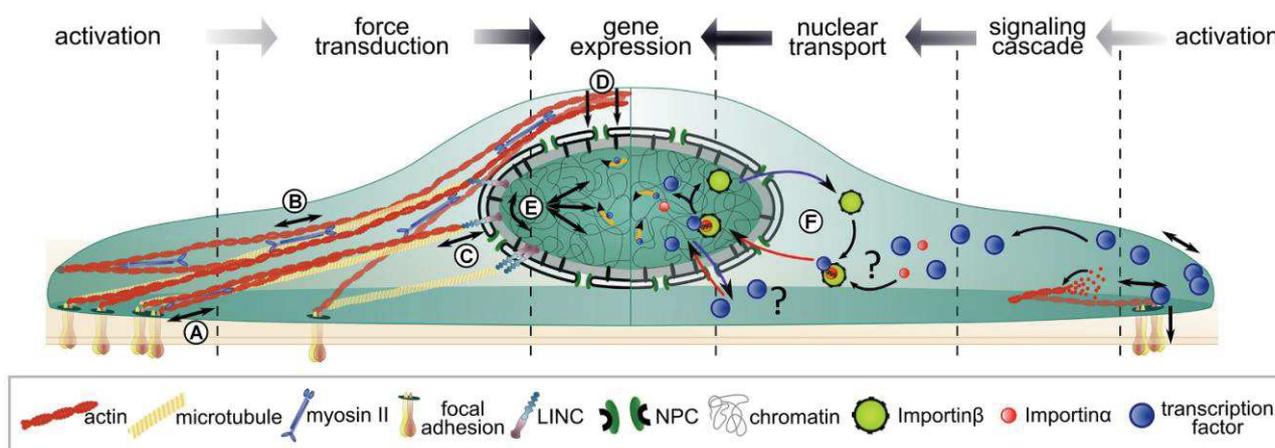


Figure 7 : Processus chimique et mécanique de mécanotransduction. De gauche à droite : (A) Les forces appliquées aux cellules au niveau des adhésomes se propagent au cytosquelette d'actine. (B) Les filaments d'actine et la myosine II génèrent des contraintes mécaniques internes. (C) Les complexes LINC et (D) le capuchon d'actine nucléaire propagent des signaux mécaniques qui déforment le noyau. (E) Dans l'ensemble, ces processus déforment l'enveloppe nucléaire et affectent l'organisation de la chromatine. (F) En plus de la déformation nucléaire, les signaux mécaniques peuvent activer des cascades de signalisation mécanoréactives. Ces molécules comprennent des facteurs transcriptionnels mécanosensibles, introduits dans le noyau par les pores nucléaires (Adapté de Kassianidou *et al.* 2019).

L'étude du processus de mécanotransduction semble particulièrement intéressante dans le cadre de cette thèse puisque les DPSCs peuvent migrer du centre de la pulpe, dont le module de Young a été évalué à 5 kPa (Ozcan *et al.* 2016), vers la dentine, dont le module d'élasticité est de l'ordre du GPa (Ziskind *et al.* 2011). Actuellement, l'investigation du processus de mécanotransduction est fortement liée à l'étude de la distribution nucléocytoplasmique des facteurs de transcription mécanosensibles YAP et TAZ que nous présenterons dans la partie suivante.

2.2.1 Rôle de YAP/TAZ dans la mécanotransduction

La mécanotransduction concerne tous les types cellulaires, dont les MSCs. En effet, la différenciation des MSCs est non seulement régulée par des signaux chimiques, mais également par des signaux mécaniques provenant du microenvironnement. Ces stimuli peuvent être passifs, comme la rigidité du substrat (Engler *et al.* 2006) et la surface disponible pour l'adhésion cellulaire (McBeath *et al.* 2004), ou actifs comme la compression dynamique (Angele *et al.* 2004) et la mise en tension du substrat (Baker *et al.* 2011). Ainsi, les matrices molles ($E = 0,1-1$ kPa), qui imitent l'élasticité des tissus neuronaux, sont neurogènes, les matrices présentant un module de Young similaire aux muscles sont myogéniques ($E = 8-17$ kPa) et les matrices rigides, qui imitent les tissus ostéoïdes ($E = 25-40$ kPa), s'avèrent ostéogéniques (Engler *et al.* 2006). Une étude sur le rôle de la forme cellulaire dans la différenciation des MSCs a montré que les cellules disposant chacune d'une surface de $10000 \mu\text{m}^2$ pour adhérer et s'étaler se sont différenciées en ostéoblastes tandis que les cellules sur une matrice de même rigidité mais de surface réduite ($1024 \mu\text{m}^2$) sont devenues des adipocytes (McBeath *et al.* 2004). Concernant les stimuli dynamiques, une étude a montré que la compression mécanique cyclique favorise la différenciation chondrogénique (Angele *et al.* 2004). De manière similaire, la culture de MSCs sur des matrices en tension a changé leur profil d'expression génétique par rapport aux expériences contrôles (Baker *et al.* 2011).

Les phénomènes décrits ci-dessus ont été corrélés à la distribution nucléocytoplasmique de deux régulateurs transcriptionnels mécanosensibles : la Yes-associated protein (YAP) et son homologue, TAZ (transcriptional co-activator with PDZ binding motif) (Dupont *et al.* 2011). En effet, la distribution nucléocytoplasmique de YAP/TAZ varie en fonction des caractéristiques physiques de la matrice, en particulier la rigidité du substrat. Pour des cellules épithéliales mammaires cultivées sur des hydrogels rigides ($E = 15-40$ kPa), YAP/TAZ montre une localisation nucléaire comparable à celle

des cellules cultivées sur du plastique. Inversement, la croissance de ces cellules sur des matrices molles ($E = 0,7-1$ kPa) provoque une localisation cytoplasmique de YAP/TAZ (Dupont *et al.* 2011). Dans une étude portant sur des cellules souches limbiques, qui sont des cellules souches épithéliales cornéennes, le pourcentage de cellules montrant la localisation nucléaire de YAP/TAZ est de 45% sur un substrat présentant un module de Young de 65 kPa contre seulement 15% sur un substrat présentant un module d'élasticité de 15 kPa (Foster *et al.* 2014). YAP/TAZ sont également cytoplasmiques dans des fibroblastes embryonnaires de souris cultivés sur des matrices avec un module de Young inférieur à 5 kPa (Elosegui-Artola *et al.* 2017). Les mêmes observations sont retrouvées sur les MSCs, pour lesquelles YAP/TAZ sont nucléaires sur des substrats durs ($E = 15-40$ kPa) et cytoplasmiques sur des substrats mous ($E \sim 1$ kPa) (Dupont *et al.* 2011) (Figure 8). Collectivement, ces données indiquent que la distribution nucléocytoplasmique de YAP/TAZ, et donc leur activité, sont régulées par la rigidité de la MEC (Dupont *et al.* 2011).

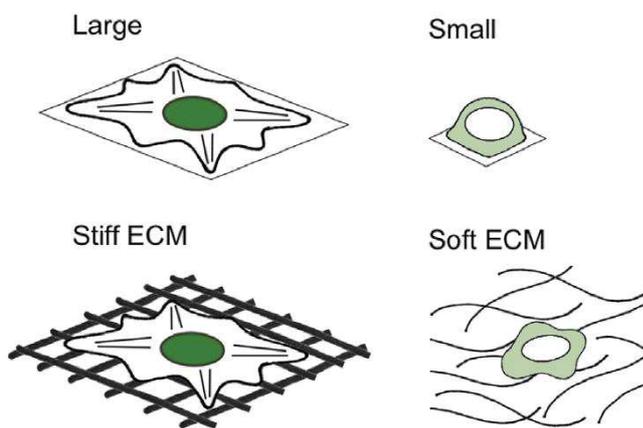


Figure 8 : Modification de la distribution nucléocytoplasmique de YAP/TAZ en fonction de la forme des cellules et de la rigidité de la MEC (Adapté de Dupont 2016).

Les MSCs ont non seulement été utilisées comme modèle pour déterminer la capacité de YAP/TAZ à s'adapter à la rigidité de la matrice, mais également pour comprendre la capacité de ces facteurs de transcription à contrôler les réponses biologiques générées par les divers signaux mécaniques perçus par les cellules. Les MSCs, sont connues pour se différencier en ostéoblastes lorsqu'elles sont cultivées sur des matrices rigides ou sur de grandes surfaces, et en adipocytes sur des matrices molles ou présentant de petites surfaces (McBeath *et al.* 2004, Engler *et al.* 2006). Une étude a montré que la différenciation induite par une matrice rigide et des surfaces d'étalement importantes nécessite l'activation de YAP/TAZ et, inversement, que la différenciation cellulaire associée aux matrices molles et aux surfaces d'adhésion limitées exige l'inactivation de YAP/TAZ. En effet, la différenciation ostéogénique induite dans les MSCs sur les matrices rigides est remplacée par une différenciation adipogénique lorsque les facteurs de transcription YAP/TAZ sont maintenus à l'état

inactif. De même, lors de l'inactivation de YAP/TAZ, les cellulesensemencées sur les surfaces étendues se comportent comme si elles étaientensemencées sur de petits îlots. A l'inverse, la surexpression de YAP/TAZ permet la différenciation ostéogénique de MSCs cultivées sur des substrats mous. Ces données suggèrent que YAP/TAZ sont nécessaires pour la différenciation cellulaire déclenchée par la rigidité et la géométrie de la matrice. Ainsi, l'activation de YAP/TAZ semble jouer un rôle crucial dans l'adaptation des comportements cellulaires aux propriétés physiques de la MEC.

Actuellement, peu d'études se sont intéressées à la distribution nucléocytoplasmique de YAP/TAZ au niveau des DPSCs. La première étude parue à ce sujet rapporte les changements induits au niveau de la migration, la prolifération et la différenciation des DPSCs exposées à un champ magnétique statique (Zheng *et al.* 2018). Cette étude montre que les DPSCs exposées à un champ magnétique statique de 1 mT pendant 24 h prolifèrent et migrent plus rapidement et que leur différenciation ostéogénique est augmentée. Ces observations sont corrélées à une augmentation de la localisation de YAP/TAZ au niveau du noyau. Ainsi, la localisation nucléaire de YAP/TAZ au niveau des DPSCs pourrait être corrélée à une prolifération, migration et différenciation ostéogénique augmentées (Zheng *et al.* 2018). Ces résultats doivent néanmoins être analysés avec prudence car les changements de comportement sont liés à l'application d'un champ magnétique et ne s'appliquent peut-être pas aux modulations du comportement cellulaire liées à la rigidité (Zheng *et al.* 2018). Une seconde étude portant sur l'influence de matrices présentant des topographies de surface variées sur l'organisation cytosquelettique et la différenciation des DPSCs a montré qu'une localisation essentiellement nucléaire de YAP/TAZ est corrélée à la différenciation ostéogénique ou odontogénique des DPSCs (Du *et al.* 2019).

2.2.2 Mécanismes de régulation de l'activité de YAP/TAZ

YAP et TAZ sont deux régulateurs transcriptionnels mécanosensibles qui jouent un rôle majeur dans le processus de mécanotransduction. Ils présentent une redondance fonctionnelle importante et sont les régulateurs principaux de multiples processus cellulaires (Plouffe *et al.* 2018). Le principal mécanisme de régulation de YAP/TAZ est leur accumulation nucléaire ou cytoplasmique (navette nucléocytoplasmique) qui est affectée par de nombreux stimuli chimiques et mécaniques (Dupont *et al.* 2011).

2.2.2.1 Voie Hippo

Au niveau biochimique, YAP/TAZ sont régulés par la voie de signalisation Hippo, connue pour limiter la croissance des tissus chez les adultes ainsi que pour moduler la prolifération, la différenciation et la migration des cellules dans les organes en développement (Meng *et al.* 2016). La régulation de YAP/TAZ par la voie Hippo s'effectue au travers de l'activité des Mammalian STE20-like (MST) protein kinases et large tumor suppressor homolog (LATS) kinases, qui entraînent la phosphorylation de YAP/TAZ et favorise leur liaison à des facteurs de rétention cytosoliques, dont la protéine 14-3-3 (Meng *et al.* 2016). Lors de l'inactivation de la voie Hippo, YAP/TAZ sont transloqués vers le noyau, grâce à l'activité de la GTPase RhoA, où ils favorisent la transcription des gènes par interaction avec d'autres facteurs de transcription plutôt que par liaison directe à l'acide désoxyribonucléique (ADN) (Figure 9). Les facteurs de transcription Transcriptional enhanced associate domain 1-4 (TEAD) sont les partenaires de liaison de YAP/TAZ les mieux identifiés (Zhao *et al.* 2008) et agissent comme des facteurs de rétention nucléaire de YAP/TAZ (Chan *et al.* 2009). YAP/TAZ peuvent également s'associer à d'autres facteurs de transcription pour réguler leur expression génique. C'est notamment le cas du Runt-related transcription factor 2 (RUNX2), un facteur de transcription étroitement associé à la différenciation ostéoblastique. (Hong *et al.* 2005).

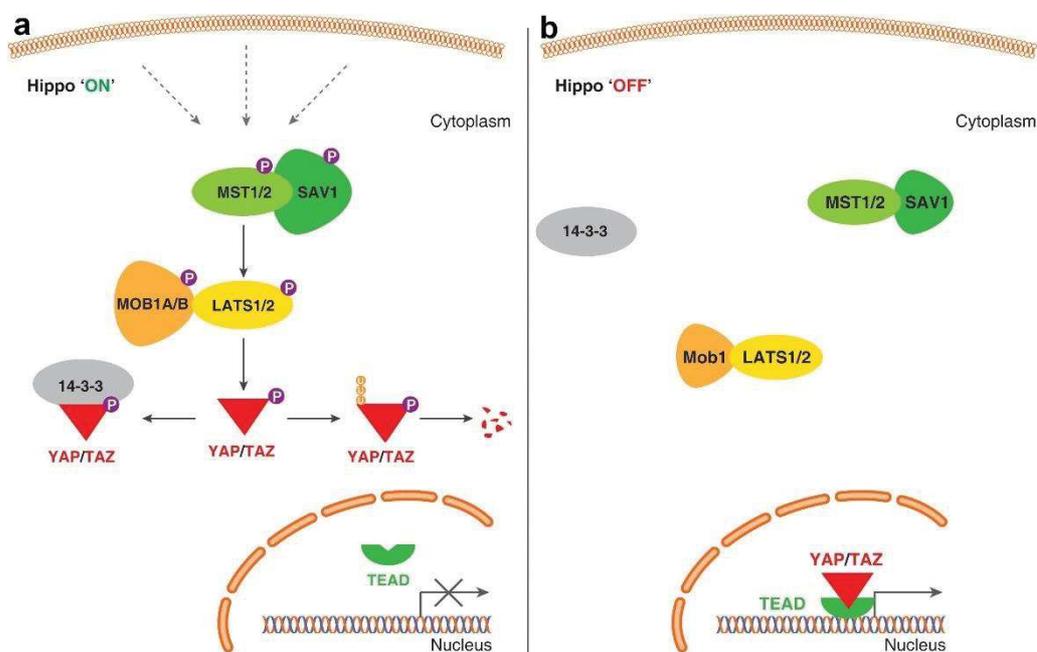


Figure 9 : Voie de signalisation Hippo-YAP/TAZ. (a) Lorsque la voie de signalisation Hippo est active, plusieurs signaux en amont régulent la phosphorylation des kinases MST1/2, LATS1/2 qui entraînent la phosphorylation de YAP/TAZ, stimulant leur rétention cytoplasmique ou leur dégradation protéolytique. (b) Lorsque cette voie est inactive, YAP/TAZ sont localisés dans le noyau, formant un complexe avec les facteurs de transcription TEAD et régulant l'expression génique (Boopathy et Hong 2019).

2.2.2.2 Régulation mécanique de YAP/TAZ

La voie de signalisation Hippo a longtemps été considérée comme le seul déterminant de la régulation de YAP/TAZ. Cependant, des études récentes suggèrent que la distribution nucléocytoplasmique de YAP/TAZ varie également en fonction des signaux mécaniques perçus par la cellule. (Dupont *et al.* 2011, Elosegui-Artola *et al.* 2016). En effet, la phosphorylation par les LATS kinase n'inhibe pas l'accumulation nucléaire de YAP induite par des signaux mécaniques (Dupont *et al.* 2011, Wada *et al.* 2011). Ces données indiquent que la phosphorylation de YAP/TAZ par les kinases LATS en aval de la voie de signalisation Hippo n'est pas le principal médiateur des signaux physiques dans la régulation de l'activité YAP/TAZ. En parallèle, des études récentes ont montré que la dynamique du cytosquelette influence l'activité de YAP/TAZ. Par exemple, l'inhibition de l'assemblage des filaments d'actine par la latrunculine (Dupont *et al.* 2011) ou l'inhibition de la myosine II avec de la blebbistatine entravent l'accumulation de YAP/TAZ dans le noyau (Dupont *et al.* 2011). Ainsi, les signaux mécaniques et la voie Hippo sont deux voies de signalisation parallèles convergeant vers la régulation YAP/TAZ.

La mécanotransduction peut donc être médiée par le cytosquelette d'actine qui lie la MEC aux fibres de stress par l'intermédiaire de la taline et les fibres de stress au noyau par l'intermédiaire du complexe protéique linker of nucleoskeleton and cytoskeleton (LINC complex) (Dahl *et al.* 2008, Wang *et al.* 2009). Les interactions des cellules avec leur substrat peuvent ainsi conduire à une tension cytosquelettique qui exerce des forces externes sur le noyau, entraînant sa déformation. Ainsi, une étude comparant le volume nucléaire des MSCs sur des substrats mous et rigides a montré qu'il était significativement plus important sur les substrats rigides que sur les substrats mous et que la sphéricité était plus faible sur les substrats rigides que sur les substrats mous (Killaars *et al.* 2018). Ces observations permettent d'établir un lien entre la localisation nucléaire de YAP/TAZ, l'activité de la taline, la tension du cytosquelette d'actine et l'intégrité du complexe LINC. Les forces exercées au niveau des adhésomes atteignent le noyau au travers du cytosquelette d'actine et du complexe LINC, déclenchant l'entrée nucléaire de YAP/TAZ indépendamment de la voie Hippo (Elosegui-Artola *et al.* 2017). La localisation nucléaire de YAP/TAZ nécessite donc l'intégrité du cytosquelette et la contractilité de la myosine (Dupont *et al.* 2011).

Les mécanismes cytosquelettiques qui sous-tendent la localisation nucléaire de YAP/TAZ sont incomplètement élucidés, mais certains éléments ont été mis en évidence. Premièrement, les filaments d'actine séquestrent des protéines de la famille de l'angiomotine (AMOT). Lors de la dépolymérisation

de ces filaments, les protéines AMOT libérées peuvent se lier à YAP, favorisant ainsi sa rétention cytoplasmique (Mana-Capelli *et al.* 2014). L'augmentation de la tension cellulaire et la polymérisation des filaments d'actine entraînent donc une augmentation de la localisation nucléaire de YAP. A l'inverse, les protéines qui coiffent (CapZ) ou entraînent la dépolymérisation des filaments d'actine (cofilin, gelsolin, latrunculine) réduisent la localisation nucléaire de YAP/TAZ (Aragona *et al.* 2013). Les Rho GTPases sont également des médiateurs essentiels reliant les stimuli mécaniques à la voie de signalisation Hippo (Yu et Guan 2013). Il a été démontré que l'activation de RhoA augmente fortement l'activité de YAP/TAZ (Dupont *et al.* 2011, Zhao *et al.* 2012), qui peut également être modulée par Rac et Cdc42 (Zhao *et al.* 2012). Ainsi, l'inhibition de ROCK par Y27632 réduit la localisation nucléaire de YAP/TAZ (Dupont *et al.* 2011). Les protéines régulatrices de la dynamique de l'actine ne jouent néanmoins pas toutes un rôle dans la distribution nucléocytoplasmique de YAP/TAZ. Par exemple, l'inhibition du complexe Arp2/3 par CK666 ne semble pas modifier la localisation de YAP/TAZ (Aragona *et al.* 2013).

En plus d'être régulée par la voie de signalisation Hippo initialement décrite, la distribution nucléocytoplasmique de YAP/TAZ est modulée par la dynamique du cytosquelette d'actine ainsi que par d'autres voies de signalisation non développées dans cette thèse, (voies de signalisation associées aux jonctions intercellulaires) mais apparaissant brièvement ci-dessous (Figure 10).

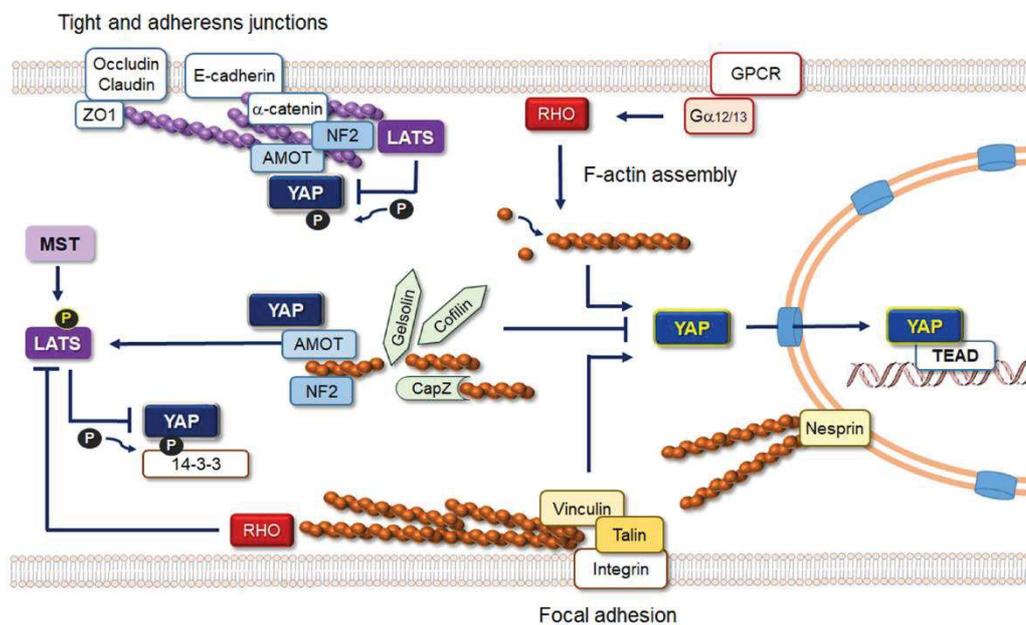


Figure 10 : Régulation de la voie de signalisation Hippo par la dynamique du cytosquelette d'actine. Les filaments d'actine associés aux jonctions intercellulaires régulent négativement l'activité YAP/TAZ, tandis que les fibres de stress associées aux adhésomes favorisent leur transport nucléaire. L'activation des GTPases Rho par les récepteurs couplés aux protéines G (GPCR) ou par les stimuli mécaniques au niveau des adhésions focales favorise l'assemblage de filaments d'actine et la localisation nucléaire de YAP/TAZ. Les protéines de coiffage et de dépolymérisation des filaments d'actine inhibent l'activité de YAP/TAZ indépendamment des LATS kinases. Les protéines AMOT et la Neurofibromine 2 (NF2) favorisent dans la rétention cytoplasmique de YAP/TAZ et facilitent leur phosphorylation par les LATS kinases (Seo *et al.* 2018).

2.2.2.3 Influence de YAP/TAZ sur la migration

Les interactions décrites ci-dessus mettent également en évidence l'intrication de la distribution nucléocytoplasmique de YAP/TAZ et de la migration cellulaire. La migration cellulaire est amorcée par la génération de forces de traction induites par la tension du cytosquelette d'actine et la maturation des adhésomes. Par la suite, le maintien de la migration exige un remodelage du cytosquelette et un désassemblage des adhésions focales à l'arrière de la cellule. Une étude récente menée sur des cellules endothéliales a montré que les coactivateurs transcriptionnels YAP/TAZ modulent la migration cellulaire par un processus de rétroaction cellulaire intrinsèque autonome c'est-à-dire non modifié par les contacts intercellulaires (Mason *et al.* 2019). La tension cytosquelettique générée par l'activation de la myosine II par ROCK cause la localisation nucléaire YAP/TAZ. Une fois dans le noyau, YAP/TAZ inhibent la phosphorylation des chaînes légères de myosine médiée par ROCK, empêchant la suractivation de la myosine II. YAP/TAZ dissipent donc les tensions cytosquelettiques et limitent la maturation des adhésions focales pour permettre le maintien de la migration cellulaire (Figure 11) (Mason *et al.* 2019).

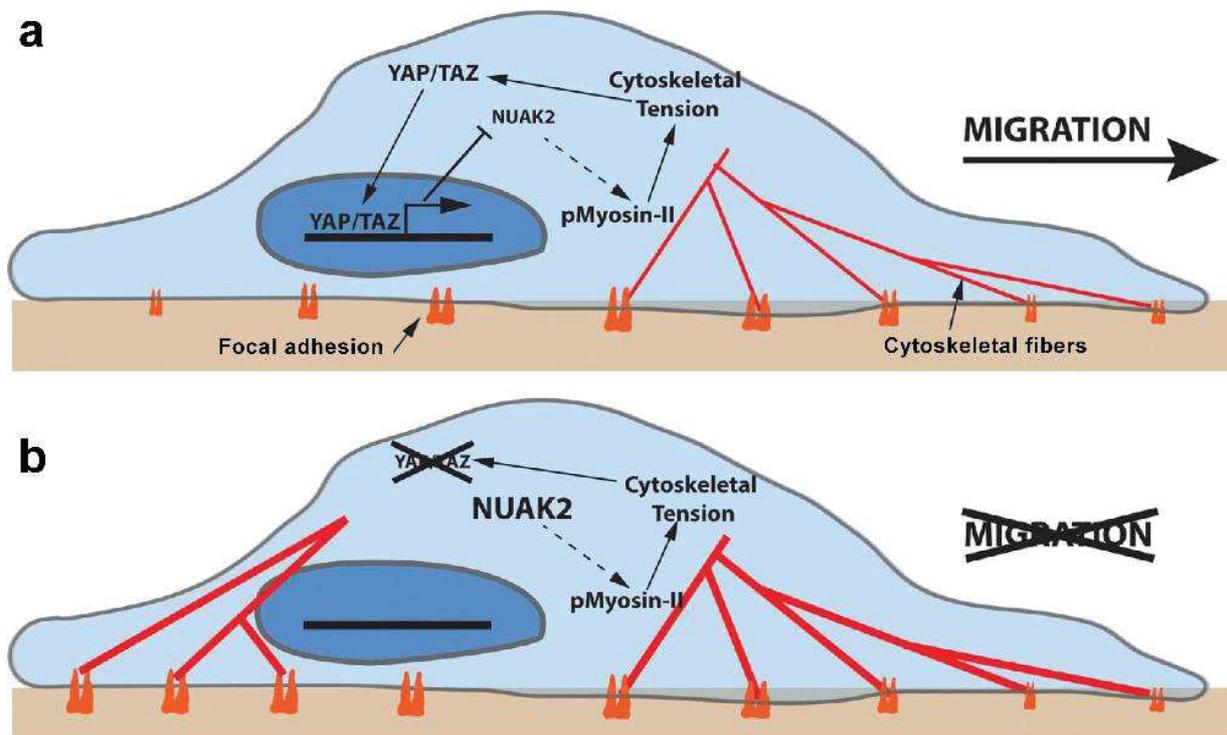


Figure 11 : Rôle de YAP/TAZ dans la régulation de la tension cytosquelettique. (a) La tension cytosquelettique induit la translocation de YAP/TAZ vers le noyau, qui modèrent la phosphorylation de la myosine II. (b) L'inactivation de YAP/TAZ entraîne une tension excessive du cytosquelette par phosphorylation excessive de la myosine et une surmaturation des adhésions focales, ce qui provoque un arrêt de la migration cellulaire (Nair et Wirtz 2019).

2.2.3 Entrée de YAP/TAZ dans le noyau

La distribution nucléocytoplasmique de YAP/TAZ est donc critique pour la différenciation et la migration cellulaire. Bien que diverses voies de régulation aient été décrites, le mécanisme d'entrée de YAP/TAZ dans le noyau suscite encore beaucoup d'interrogations. Encore récemment, YAP/TAZ étaient supposés diffuser à travers la membrane nucléaire et leur régulation semblait déterminée par leurs liaisons à des facteurs de rétention cytoplasmiques (protéines 14-3-3) et nucléaires (TEAD). Néanmoins, ces interactions ne suffisent pas à expliquer les translocations de YAP/TAZ en réponse aux nombreux stimuli physiques et chimiques (Kofler *et al.* 2018). Actuellement, deux modèles complémentaires ont été suggérés pour expliquer les mécanismes d'entrée et de sortie de YAP/TAZ dans le noyau.

La première explication est purement mécanique. En effet, une étude récente a montré que l'application d'une force au niveau du noyau est suffisante pour provoquer la localisation nucléaire de YAP/TAZ, indépendamment de la rigidité du substrat, de l'intégrité des adhésions focales et du cytosquelette d'actine ou des contacts intercellulaires (Elosegui-Artola *et al.* 2017). De plus, l'export nucléaire de YAP/TAZ ayant lieu immédiatement après le relâchement de la force, prouve que la translocation nucléaire de YAP/TAZ n'est pas due à la rupture de la barrière nucléocytoplasmique sous l'effet de la force. L'augmentation du transport de YAP/TAZ peut avoir lieu en réponse à des forces appliquées soit directement par le cytosquelette ou provoquées par une augmentation de la rigidité du substrat (Elosegui-Artola *et al.* 2017). Ces forces entraînent l'aplatissement nucléaire, ce qui augmente la taille et la perméabilité des pores nucléaires et favorise l'importation de YAP/TAZ par rapport à leur exportation. Concrètement, sur les substrats mous, les pores nucléaires limitent mécaniquement l'importation de YAP/TAZ. Cette restriction est réduite par l'aplatissement du noyau provoqué par les forces transmises sur les substrats rigides (Elosegui-Artola *et al.* 2017).

Une explication complémentaire est que le transport de TAZ, et probablement de YAP, est un processus médié par des signaux de localisation et d'export nucléaire (NLS et NES) (Kofler *et al.* 2018). L'activité de RhoA permet l'importation de TAZ dans le noyau grâce au NLS localisé à l'extrémité C-terminale de TAZ. Le NES se trouve au niveau du domaine de liaison TEAD et peut être masqué par cette dernière, empêchant ainsi l'export de TAZ (Kofler *et al.* 2018).

Le transport nucléocytoplasmique de YAP/TAZ n'est donc pas lié à leur diffusion passive, mais peut être contrôlé mécaniquement par la déformation des pores nucléaires et chimiquement par leur transport actif (Elosegui-Artola *et al.* 2017, Kofler *et al.* 2018).

2.3 Chromatine

La connexion directe entre la MEC et le noyau, assurée par la fixation du cytosquelette au complexe LINC, permet aux tensions cytosquelettiques créées par les interactions des cellules avec leur substrat d'exercer des forces externes sur le noyau, entraînant sa déformation. Ces forces peuvent non seulement influencer la distribution nucléocytoplasmique de YAP/TAZ, comme décrit précédemment, mais également induire des changements dans l'organisation de la chromatine et par conséquent moduler l'expression des gènes. La modulation de l'organisation de la chromatine fait donc partie intégrante de l'étude de l'influence de la rigidité du substrat sur les comportements des DPSCs. Afin de clarifier cette idée, cette partie s'attache à rappeler brièvement la structure de la chromatine et les mécanismes de sa régulation les plus étudiés, avant de développer le lien entre rigidité du substrat et compaction de la chromatine.

2.3.1 Structure de la chromatine

La principale fonction de l'ADN est de porter les gènes qui contiennent l'information spécifiant l'ensemble des molécules d'acide ribonucléique (ARN) et des protéines synthétisées par les cellules et de contrôler leurs expressions. L'ADN est compacté au sein du noyau de chaque cellule par des protéines spécialisées qui se fixent dessus et le replient, engendrant une série de boucles agencées de manière à produire des niveaux d'organisation plus élevés. Les protéines qui se fixent sur l'ADN pour contrôler son organisation sont traditionnellement divisées en deux classes : les histones et les protéines non-histones. Le complexe formé par ces deux classes de protéines avec l'ADN nucléaire des cellules eucaryotes est appelé chromatine. Les histones sont responsables du premier niveau de l'organisation de l'ADN : le nucléosome. Ce nucléosome est composé d'un octamère d'histones (comprenant deux exemplaires des histones H2A, H2B, H3 et H4) autour duquel s'enroule un brin d'ADN mesurant 146 paires de nucléotides (Felsenfeld et Groudine 2003). Les extrémités des chaînes protéiques des histones sont accessibles à des enzymes pouvant les modifier chimiquement. Chaque nucléosome est relié à ses voisins par un court segment d'ADN de liaison. Cette chaîne de polynucléosomes peut également être pliée en une fibre compacte d'un diamètre de ~30 nm, stabilisée par la liaison d'une cinquième histone : H1 (Felsenfeld et Groudine 2003).

En fonction de son niveau de compactage, la chromatine s'organise en euchromatine et hétérochromatine (Figure 12). L'euchromatine est peu condensée et présente une densité relativement faible d'ADN ainsi qu'une activité transcriptionnelle importante. L'hétérochromatine est très condensée et existe sous deux formes fonctionnellement distinctes : les hétérochromatines constitutive et facultative (Felsenfeld et Groudine 2003). L'hétérochromatine constitutive se trouve principalement dans les régions pauvres en gènes et permet la ségrégation chromosomique pendant la division cellulaire (Watts *et al.* 2018). En revanche, l'hétérochromatine facultative se trouve dans les régions à forte densité génétique dont le compactage et l'expression sont régulés de manière dynamique au cours du développement (Watts *et al.* 2018). C'est par exemple le cas des gènes spécifiques du type cellulaire (Becker *et al.* 2016). La plupart des gènes présents dans l'hétérochromatine sont néanmoins complètement réprimés (Watts *et al.* 2018).

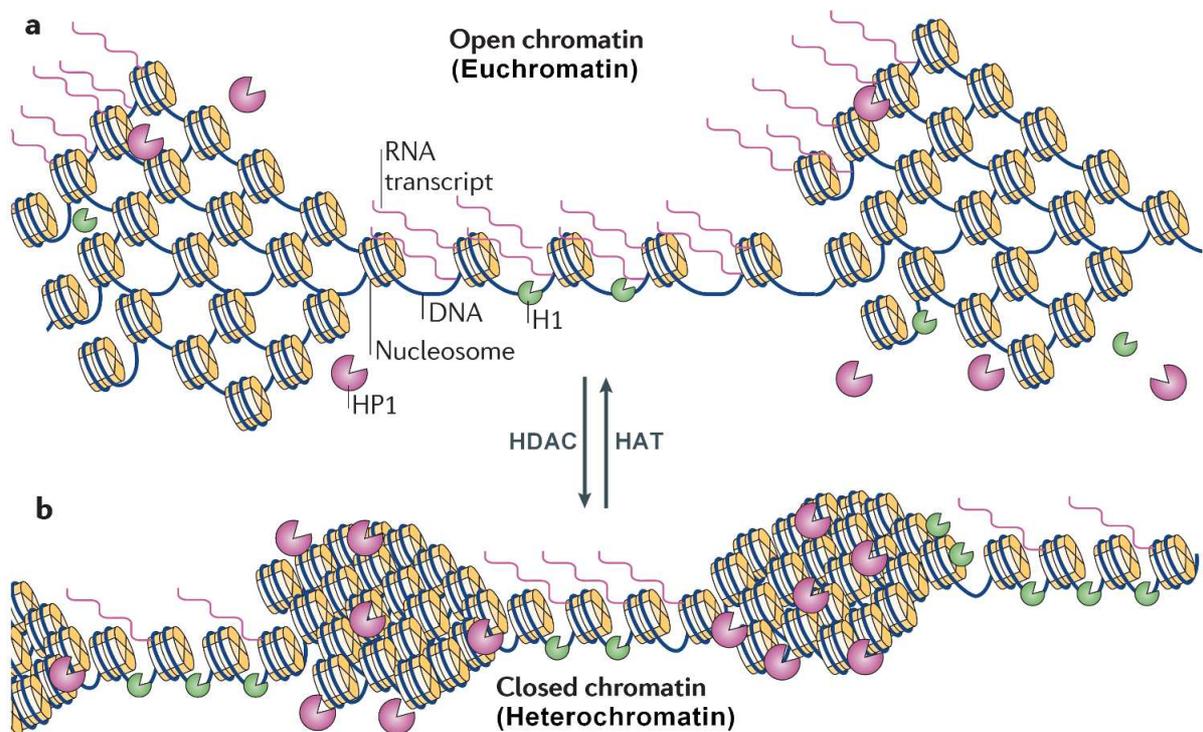


Figure 12 : Structure de l'euchromatine (a) et de l'hétérochromatine (b) et rôles des HATs et HDACs. La désacétylation des histones par les HDACs entraîne la condensation de l'euchromatine en hétérochromatine tandis que l'acétylation de cette dernière par les HATs entraîne sa décondensation en euchromatine (Adapté de Gaspar-Maia *et al.* 2011).

L'observation des noyaux d'eucaryotes par microscopie électronique en transmission (MET) révèle que l'hétérochromatine se trouve généralement dans des régions spécifiques incluant la périphérie du nucléole et la périphérie nucléaire, à l'exception des zones occupées par les pores nucléaires (Fedorova et Zink 2008) (Figure 13). Au niveau de la périphérie nucléaire,

l'hétérochromatine se lie étroitement aux lamines de la membrane nucléaire interne (Inner Nuclear Membrane : INM) par les domaines de chromatine associés aux lamines (lamin-associated chromatin domains : LADs) (Lemaître et Bickmore 2015).

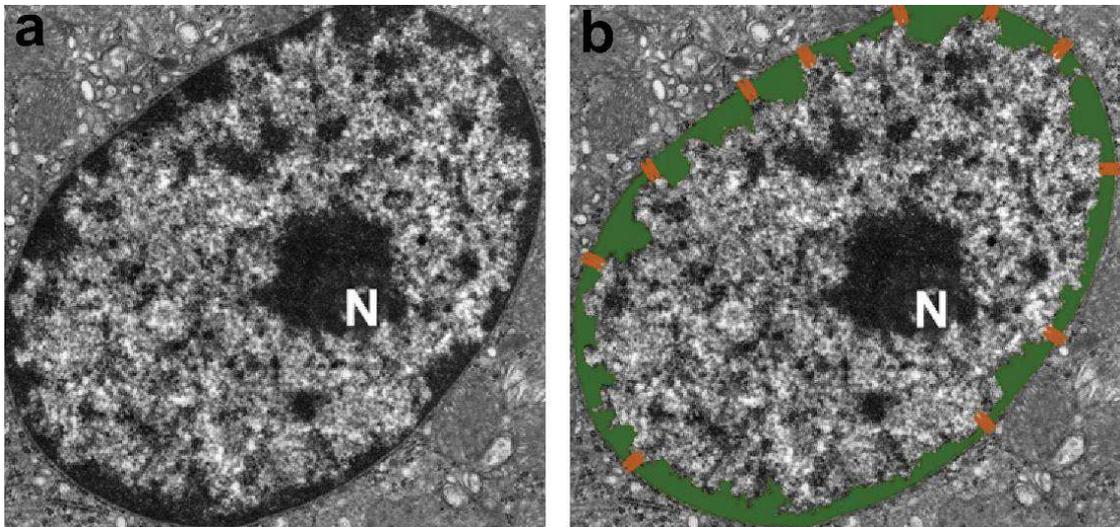


Figure 13 : Répartition de l'hétérochromatine dans un noyau eucaryote (a) Image d'un noyau cellulaire obtenue MET. (b) La disposition périmucléaire de l'hétérochromatine est surlignée en vert. Cette hétérochromatine ne couvre pas les pores nucléaires indiqués en orange. Le nucléole est indiqué par la lettre N (Adapté de Fedorova et Zink 2008).

2.3.2 Euchromatine et hétérochromatine

2.3.2.1 Histones désacétylases et histone acétyltransférases

De nombreuses modifications des queues amino-terminales des histones, dont l'acétylation, la phosphorylation et la méthylation, sont connues pour réguler l'expression génique. Les modifications les plus couramment étudiées sont la méthylation et l'acétylation. Cette dernière est régulée par deux groupes d'enzymes : les histones acétyltransférases (HATs) et les histones désacétylases (HDACs) (Kouzarides 2007, Tessarz et Kouzarides 2014). L'acétylation des histones par les HATs entraîne une décondensation de la chromatine permettant l'expression des gènes tandis que la désacétylation des histones par les HDACs entraîne la condensation de la chromatine et la répression génique (Tessarz et Kouzarides 2014) (Figure XX).

Les HDACs humaines regroupent 18 enzymes sans redondances fonctionnelles. Elles sont classées en trois groupes principaux en fonction de leur homologie avec les protéines de levures (Dokmanovic *et al.* 2007). Les histones étaient initialement considérées comme les cibles principales des HDACs, mais actuellement plus de 50 protéines non-histones ont été identifiées comme substrats de ces enzymes (Dokmanovic *et al.* 2007). La désacétylation des histones permet la condensation de l'ADN qui s'enroule plus étroitement autour des histones et augmente la proportion d'hétérochromatine dans le noyau (Figure 12). Les HDACs de classes I et II sont connues pour leur fonction dans le silence transcriptionnel de l'hétérochromatine facultative (Watts *et al.* 2018).

Le taux d'acétylation des histones peut être augmenté par inhibition des HDAC de classes I et II par des composés de faible masse moléculaire comme la trichostatine A (TSA). Cette inhibition permet l'analyse *in vivo* de l'effet de l'acétylation des histones sur la conformation chromatinienne et l'expression génétique. Dans ces conditions expérimentales, la décondensation de la chromatine commence après 3-4 h d'incubation avec de la TSA et atteint son effet maximal après 10 h (Görisch *et al.* 2005). Ces changements sont réversibles environ 3-4 h après l'élimination de la TSA (Görisch *et al.* 2005).

2.3.2.2 Rôle de la chromatine dans le devenir des cellules souches

De nombreuses études ont estimé que le ratio euchromatine/hétérochromatine pouvait être lié au niveau de différenciation des cellules (Gaspar-Maia *et al.* 2011). En effet, les histones des cellules souches embryonnaires pluripotentes sont plus acétylées et donc leur chromatine moins condensée que celles des cellules somatiques (Gaspar-Maia *et al.* 2011, Becker *et al.* 2016). Par ailleurs, l'inhibition des HDACs améliore la reprogrammation de cellules somatiques en cellules souches pluripotentes induites (Becker *et al.* 2016). Dans l'ensemble, les données actuelles suggèrent que l'hétérochromatine constitue un obstacle à la reprogrammation de la pluripotence et empêche l'expression de gènes spécifiques de certaines lignées cellulaires (Becker *et al.* 2016). L'hétérochromatine semble donc essentielle dans le maintien de l'identité cellulaire.

2.3.3 Lien entre condensation de la chromatine et rigidité du substrat

Des études récentes indiquent que le remodelage de la chromatine joue probablement un rôle clé dans la façon dont les MSCs intègrent les signaux physiques de leur environnement. Par exemple, lorsque les MSCs sont ensemencées sur des matrices ensuite soumises à un étirement de 10%, la condensation de leur chromatine augmente de 20% par rapport aux cellules témoins (Heo *et al.* 2016). Une autre étude a montré que les MSCs cultivées sur des surfaces de polydiméthylsiloxane (PDMS) comportant des rainures de 10 μm présentaient des niveaux plus élevés d'acétylation des histones H3 et une activité réduite des HDAC par rapport aux cellules cultivées sur une surface lisse (Downing *et al.* 2013). Ces résultats ont été complétés par une étude récente qui a élégamment montré que la rigidité du substrat peut induire des changements dans l'organisation de la chromatine de MSCs (Killaars *et al.* 2018).

En effet, après 3 jours de culture sur des hydrogels rigides ($E = 32,7$ kPa) et mous ($E = 5,5$ kPa) les MSCs montrent un rapport nucléocytoplasmique de YAP/TAZ et une acétylation des histones augmentés sur les substrats rigides par rapport aux substrats mous. Ces résultats sont en accord avec les résultats antérieurs (Yang *et al.* 2014) et montrent pour la première fois que l'acétylation des histones, et donc la décondensation de la chromatine, peuvent être influencées par le module de Young de la matrice. Par ailleurs, cette étude indique que la décondensation de la chromatine liée à l'acétylation des histones semble être à l'origine de l'augmentation du volume et la diminution de la sphéricité nucléaires observées sur les MSCs cultivées sur des substrats rigides, déjà évoquées dans le paragraphe 2.2.2.2 de cette thèse (Killaars *et al.* 2018).

Les mêmes observations ont été réalisées de manière dynamique en cultivant les MSCs pendant 24 h sur des substrats présentant un module de Young de 32,7 kPa avant de les ramollir à $E = 5,5$ kPa par un processus chimique sans détacher les cellules de leur matrice. Dans ces conditions expérimentales, le volume nucléaire des MSCs a diminué et YAP/TAZ sont devenus cytoplasmiques une demi-heure après le ramollissement du substrat. De plus, la condensation de la chromatine a augmenté dans l'heure suivant le changement de rigidité. Un changement consécutif du niveau d'acétylation des histones n'a été observé qu'après une période de 72 h. Les auteurs ont conclu que la tension du cytosquelette influence l'acétylation des histones, mais que l'augmentation de l'activité des HDACs nécessaire à cette désacétylation a lieu de manière différée (Killaars *et al.* 2018). Cette observation a été renforcée par la perturbation chimique du cytosquelette par de la blebbistatine qui diminue le volume nucléaire ainsi que le rapport nucléocytoplasmique de YAP/TAZ et accentue la

condensation de la chromatine sur les substrats rigides mais n'a pas d'effet statistiquement significatif sur les substrats mous (Killaars *et al.* 2018). L'absence d'effet de la blebbistatine sur la répartition nucléocytoplasmique de YAP/TAZ et la condensation de la chromatine sur les substrats mous pourrait indiquer que la tension du cytosquelette influence moins certains aspects nucléaires sur les substrats mous que sur les substrats rigides.

Collectivement, ces résultats indiquent que la chromatine est décondensée par acétylation des histones lorsque les MSCs sont cultivées sur des substrats rigides, tandis que la chromatine est condensée par désacétylation des histones par des HDACs de classe I (plus spécifiquement HDAC1, HDAC2 et HDAC3) lorsque les MSCs sont cultivées sur des substrats mous (Killaars *et al.* 2018). Par ailleurs, il a été montré que les modifications de la morphologie nucléaire, l'acétylation des histones et la condensation de la chromatine sont réversibles lorsque le temps d'exposition à des substrats rigides est court, mais peuvent devenir irréversibles avec une exposition prolongée (Killaars *et al.* 2018).

2.3.4 Condensation de la chromatine et distribution nucléocytoplasmique de YAP/TAZ

L'étude de Killaars *et al.* (2018) a montré la corrélation entre la décondensation de la chromatine et la distribution nucléocytoplasmique de YAP/TAZ. Bien qu'aucun mécanisme liant ces deux phénomènes n'ait été décrit dans la littérature, certaines études ont suggéré une explication.

Une première étude a proposé que la condensation de la chromatine influence son accessibilité aux facteurs de transcription. Ainsi, l'acétylation des histones induite par la TSA augmente l'accessibilité de la chromatine aux complexes protéiques ayant un poids moléculaire supérieur à 200 kDa. Cette étude suggère que la modification de l'accessibilité de la chromatine, due à l'acétylation des histones, qui a été observée pourrait représenter un mécanisme de régulation important pour de nombreux complexes protéiques (Görisch *et al.* 2005) (Figure 14). Néanmoins, dans la mesure où les poids moléculaires de YAP et TAZ sont compris entre 65 kDa et 44 kDa respectivement (Sudol 1994, Kofler *et al.* 2018), ce phénomène a peu de chance d'influencer leur distribution nucléocytoplasmique.

L'augmentation du rapport nucléocytoplasmique de YAP/TAZ est probablement liée à l'augmentation du volume nucléaire, provoquée par la décondensation de la chromatine sur les substrats rigides qui pourrait entraîner une augmentation de la taille et la perméabilité des pores nucléaires et favoriser l'import de YAP/TAZ (Elosegui-Artola *et al.* 2017, Killaars *et al.* 2018). Néanmoins aucune preuve de ce phénomène n'a été apportée dans la littérature.

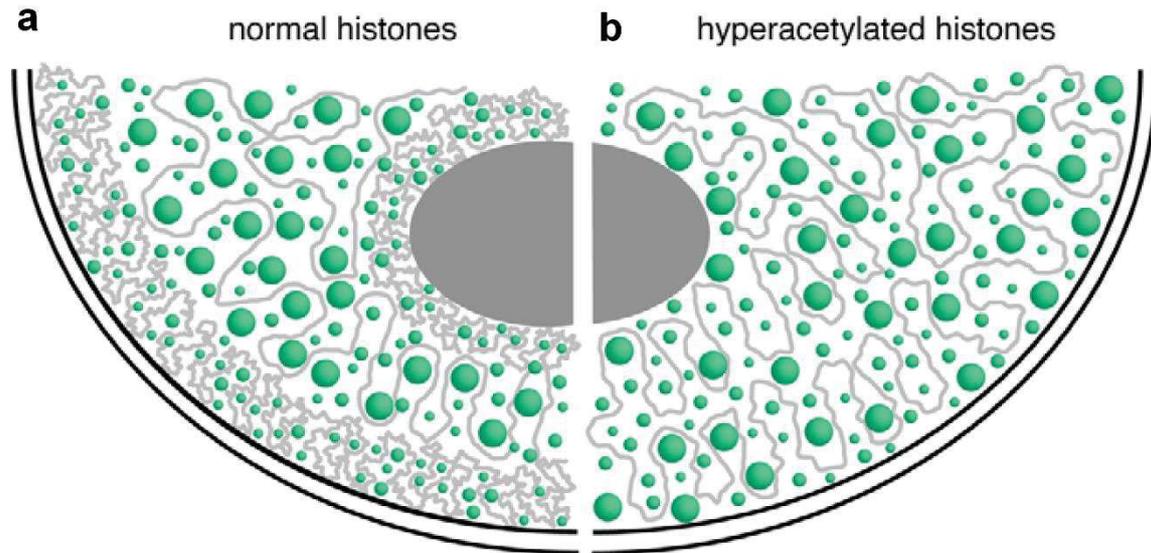


Figure 14 : Illustration de l'accessibilité de la chromatine. La chromatine est représentée en gris et les macromolécules sont représentées par les sphères vertes présentant trois tailles différentes. a) Cellule non traitée. Dans ce cas, l'hétérochromatine est accessible uniquement aux plus petites particules. Les grands complexes sont exclus de l'hétérochromatine localisée à proximité du nucléole et contre l'INM. b) Distribution des macromolécules dans une cellule traitée par TSA. L'hétérochromatine est décondensée de sorte que même les grands complexes protéiques puissent se répartir sur l'ensemble du noyau (Görisch *et al.* 2005).

Chapitre 3. Matériel et méthodes

3.1	Surfaces étudiées	67
3.1.1	Description des matrices.....	67
3.1.2	Caractérisation des matrices PDMS birigidités.....	69
3.1.3	Résumé des matrices étudiées.....	69
3.1.4	Revêtement des matrices.....	70
3.2	Culture cellulaire	71
3.2.1	Culture cellulaire NIH 3T3.....	71
3.2.2	DPSCs.....	72
3.2.3	Pré-conditionnement des DPSCs.....	76
3.3	Expériences sur la prolifération par mesure de l'activité des phosphatases	77
3.4	Microscopie par fluorescence	78
3.4.1	Protocole d'immunomarquage des cellules fixées.....	78
3.4.2	Quantification de la viabilité cellulaire.....	79
3.4.3	Observations des cellules au microscope et paramètres mesurés.....	80
3.4.4	Paramètres analysés.....	80
3.5	Microscopie électronique en transmission	81
3.5.1	Préparation des échantillons.....	81
3.5.2	Acquisition.....	82
3.5.3	Analyses morphologiques.....	82
3.6	Vidéomicroscopie	83
3.6.1	Préparation des échantillons.....	83
3.6.2	Acquisition.....	84
3.6.3	Analyse des données.....	84
3.7	Analyses statistiques	85

3.1 Surfaces étudiées

Nous avons choisi le polydiméthylsiloxane (PDMS) (Figure 1) comme substrat pour cette étude, car il est biocompatible, inerte, transparent et sa rigidité peut être contrôlée de différentes manières (Wang 2012). De plus, une large gamme de rigidités est disponible sur le marché.

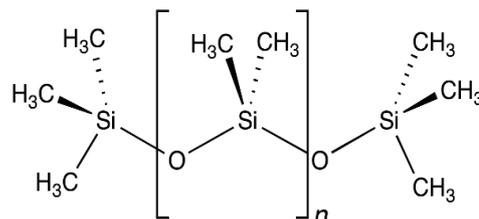


Figure 1 : Structure du polydiméthylsiloxane.

3.1.1 Description des matrices

Dans un premier temps, les comportements cellulaires ont été étudiés sur des matrices présentant une large gamme de rigidités afin d'objectiver des différences de comportements cellulaires liées au module de Young. A ce stade de l'étude, les matrices en PDMS acquises dans le commerce. Dans un second temps, nous avons souhaité observer le comportement des DPSCs lorsqu'elles étaient ensemencées sur une matrice présentant une région périphérique rigide et une région centrale molle. Pour ce faire, un protocole permettant de créer des matrices PDMS constituées de deux parties adjacentes, de deux rigidités différentes, a été établi.

3.1.1.1 Surfaces obtenues commercialement

Des μ -Dishes 35mm en verre (Ibidi, 81156), présentant une rigidité proche de celle de la dentine, ont été utilisés comme surface contrôle. Toutefois, le verre n'ayant pas les mêmes propriétés chimiques de surface que le PDMS, nous avons défini un contrôle rigide en PDMS, donc présentant les mêmes propriétés chimiques que les substrats en PDMS plus mous testés. Ainsi, les μ -Dishes 35mm en verre ont été recouverts d'une feuille de PDMS (Statice) avec un module de Young de 2,5 MPa. Des μ -Dish 35mm, high ESS (Ibidi) avec un module de Young de 1,5 kPa (Ibidi, 81291), 15 kPa (Ibidi, 81391), et 28 kPa (Ibidi, 81191) ont servi de substrats mous (Figure 2).

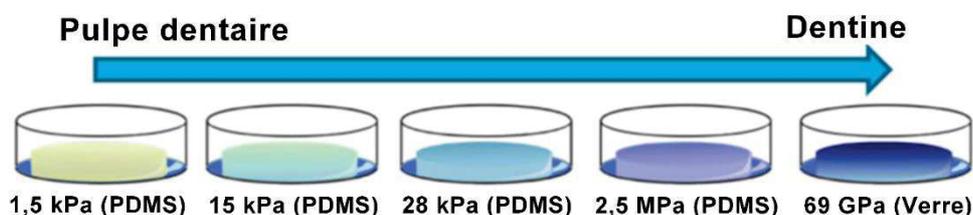


Figure 2 : Surfaces utilisées pour mimer la rigidité des environnements rencontrés par les DPSCs lors de leur migration.

3.1.1.2 Protocole de création de matrices PDMS birigidités

Des matrices de PDMS composées de deux parties adjacentes de rigidités différentes ont été obtenues en combinant l'élastomère Sylgard 184 (Dow Corning) avec le CY 52-276 (Dow Corning®) (Figure 3). Premièrement, l'agent réticulant et l'élastomère du Sylgard 184 ont été mélangés avec un rapport pondéral de 1/10. Le mélange obtenu a été dégazé et versé dans un anneau de téflon de 2 mm d'épaisseur et 2 cm de rayon, fixé sur un disque en téflon par des pinces amovibles. Le centre de l'anneau était occupé par un cube de bois de 0,8 cm de côté afin de préserver un espace libre pour le PDMS mou (Figure 3a). Le Sylgard 184 a été polymérisé pendant 35 min à 125 °C. Le cube a ensuite été retiré et le PDMS inclus dans l'anneau a été soigneusement détaché du disque en téflon puis fixé sur une lamelle de verre de 30 mm de diamètre. L'élastomère et l'agent réticulant du CY 52-276 ont été mélangés avec un rapport pondéral de 1:1 puis dégazés. Le mélange obtenu a été versé au centre de la surface et laissé à polymériser pendant une nuit à température ambiante. Les matrices PDMS résultant de ce protocole présentent donc une zone centrale molle entourée par une zone de PDMS rigide, lui-même cerclé par un anneau en téflon (Figure 3). La polymérisation de la partie centrale ayant eu directement lieu sur une lamelle de verre de 30 mm, ces matrices peuvent être observées par vidéomicroscopie sans risque de décrochage entre le support et le PDMS.

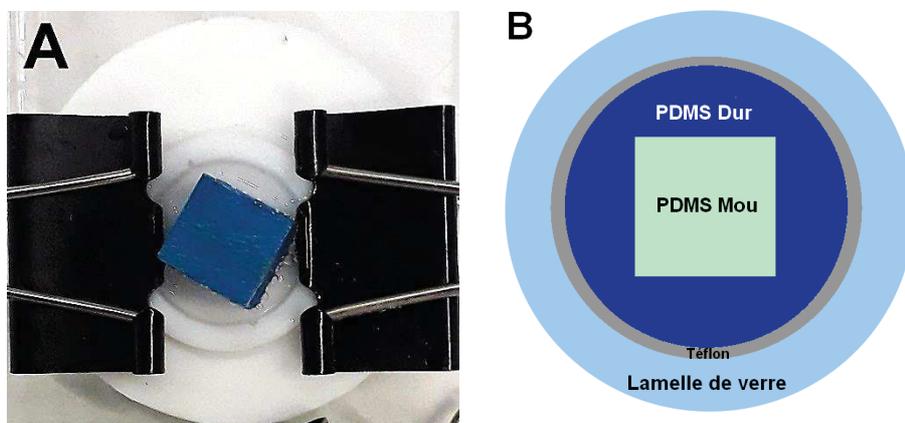


Figure 3 : Création des matrices de PDMS avec deux rigidités différentes. (A) PDMS rigide mis en place dans l'anneau de téflon fixé à un disque en téflon. Le centre de l'anneau est occupé par un cube en bois pour maintenir l'espace du PDMS mou. (B) Schéma du PDMS obtenu.

3.1.2 Caractérisation des matrices PDMS birigidités

Les disques de PDMS de 2 cm de diamètre ont été découpés dans des échantillons préparés la veille. L'épaisseur des disques de PDMS obtenus a été mesurée avec un pied à coulisse. Les échantillons ainsi obtenus ont été caractérisés par rhéologie à l'aide d'un rhéomètre Kinexus Ultra (Malvern, Grande Bretagne) à 25 °C. La déformation était de 1% et la fréquence du mouvement de cisaillement a été modulée de 50 à 0,01 Hz. Pour chaque ordre de grandeur, 10 mesures ont été effectuées. La distance entre les deux plaques du rhéomètre était constante dans chaque expérience et correspondait à l'épaisseur de l'échantillon mesuré moins 5 %. Les échantillons étaient ainsi soumis à une pré-contrainte de compression pendant l'acquisition des données. Le module de conservation (G') et le module de perte (G'') acquis sont exprimés en fonction de la fréquence. Les données expérimentales des deux échantillons PDMS E_{soft} et E_{stiff} ont été tracées indépendamment dans les figures 1 et 2. Les courbes représentant le module de conservation en fonction de la fréquence de tous les échantillons ont été superposées dans la figure 3. Les données obtenues concordent avec les données publiées (Patel *et al.* 1992).

Le module de conservation obtenu à la fréquence la plus élevée a été utilisé comme approximation du module de cisaillement des matériaux, G . A partir de cette valeur, le module de Young, E , a été estimé en utilisant un coefficient de Poisson, ν , égal à 0,3 selon la formule suivante :

$$G = \frac{E}{2(1 + \nu)}$$

3.1.3 Résumé des matrices étudiées

Les informations pertinentes sur les différentes matrices utilisées au cours de cette thèse sont rassemblées dans le tableau ci-dessous (Tableau 1). Les modules de Young indiqués dans la 4^{ème} colonne ont été donnés par le fabricant pour les matrices commerciales et déterminés au sein de l'UMR 1121 pour les PDMS composant les surfaces birigidités (protocole décrit plus haut).

Substrat	Fournisseur	Présentation	E (kPa)	Notation
Verre	Ibidi	μ -Dishes35mm	69×10^6	E_G
PDMS 2,5MPa	Statice	Feuilles d'épaisseur 1mm à découper	$2,5 \times 10^3$	$E_{2.5M}$
PDMS-Dur	Dow Corning	Elastomère et agent réticulant à mélanger	400	E_{stiff}
PDMS - Mou	Dow Corning	Elastomère et agent réticulant à mélanger	35	E_{soft}
PDMS 28 kPa	Ibidi	μ -Dish35mm, high ESS	28	E_{28k}
PDMS 15 kPa	Ibidi	μ -Dish35mm, high ESS	15	E_{15k}
PDMS 1.5 kPa	Ibidi	μ -Dish35mm, high ESS	1,5	$E_{1.5k}$

Tableau 1 : Caractéristiques des matrices utilisées.

3.1.4 Revêtement des matrices

Le PDMS étant un matériau inerte, un revêtement par une protéine de la MEC est nécessaire afin de permettre l'adhésion cellulaire. Pour cette raison, toutes les surfaces étudiées, y compris le verre, ont été recouvertes d'une couche de protéines de la MEC avant l'ensemencement des cellules. Les protéines de la MEC utilisées sont le collagène (Sigma-Aldrich), la fibronectine (Sigma-Aldrich) et la laminine (Sigma-Aldrich). Les matrices ont été préparées selon le protocole suivant : premièrement, les solutions de protéine de revêtement ont été préparées extemporanément à une concentration finale de 40 $\mu\text{g/mL}$ selon le tableau ci-dessous (Tableau 2). Les matrices ont ensuite été traitées au plasma cleaner équipé d'une lampe (UV-Ozone Procleaner Plus, BioForces Nanosciences) pendant 3 min afin de rendre les surfaces, en particulier le PDMS, hydrophiles. 150 μL de solution de la protéine de revêtement étudiée ont ensuite été déposés sur la surface et laissés pendant 1 h. La solution a ensuite été éliminée et les matrices rincées avec 0,5 mL de milieu de culture. Les cellules ont toujours été ensemencées dans l'heure suivant le dépôt du revêtement.

	Collagène	Fibronectine	Laminine
Numéro catalogue	11179179001	11051407001	11243217001
Présentation	10 mg de poudre	1 mg de poudre	Solution de laminine
Solvant	5 mL d'acide acétique dilué dans de l'eau stérile à 0,2% (v/v)	1 mL d'eau stérile	0,15 M de NaCl, 2 mM d'EDTA, 0,05 M de tampon Triss-HCl
Concentration de la solution mère	2 mg/mL	1 mg/mL	0,5 mg/mL
Dilutions utilisées	3 µL dans 147 µL d'acide acétique à 0,2%	6 µL dans 144 µL d'eau stérile	12 µL dans 138 µL d'eau stérile

Tableau 2 : Protocole de préparation des solutions de revêtement utilisées.

3.2 Culture cellulaire

3.2.1 Culture cellulaire NIH 3T3

Des cellules NIH 3T3 ont été utilisées comme cellules contrôles. Il s'agit d'une lignée de fibroblastes matures adhérents, établie à partir d'embryon Mouse Swiss NIH. La lignée de fibroblastes NIH 3T3 utilisée dans cette thèse a été achetée chez ATCC (CRL-1658TM). Les cellules ont été cultivées dans du DMEM (Dulbecco's modified Eagle's Media) (ATCC 30-2002) complémenté avec 10% de FBS (Fetal bovine serum) (Dutscher S1810-50) et 100 unités/mL de pénicilline, ainsi que 100 mg/mL de streptomycine (Dutscher, L0022-100) dans une atmosphère humide à 37°C et 5% de CO₂. Lorsqu'elles atteignaient 80% de confluence, les cellules étaient rincées avec du PBS (Tampon phosphate salin) (Dutscher, L0615-500) puis détachées en utilisant 1 mL d'une solution de trypsine-EDTA (Dutscher, L0940-100) pour une flasque de 75 cm² pendant 5 min. Les NIH 3T3 étaient alors utilisées pour l'expérience prévue et remise en culture avec une densité cellulaire de 5 × 10⁴ cellules par flasque de 75 cm².

3.2.2 DPSCs

3.2.2.1 Isolation des DPSCs

Après obtention de l'autorisation de conserver les déchets d'origine humaine à des fins de recherches (autorisation C17-78) une banque de DPSCs a été constituée. Des troisièmes molaires immatures extraites pour des raisons orthodontiques chez des donneurs sains (18 et 30 ans) ont été obtenues auprès du Pr Youssef Haikel, exerçant au pôle de médecine et de chirurgie bucco-dentaires des hôpitaux universitaires de Strasbourg et auprès du Dr Thomas Bridonneau, exerçant à la clinique Rhéna (Strasbourg). Avant l'avulsion, les explications concernant l'utilisation de leurs dents ont été données aux patients et un consentement éclairé a été obtenu.

Les troisièmes molaires ont été stockées dans un milieu de transport composé de MEM α (Minimum Essential Medium α) (Gibco, 12561056) contenant 300 unités/mL de pénicilline, ainsi que 300 mg/mL de streptomycine. Les cultures cellulaires ont été établies à l'aide de la méthode de dissociation enzymatique classiquement décrite (Gronthos *et al.* 2000). Dans l'heure suivant l'avulsion, les dents ont été nettoyées avec une compresse imbibée d'éthanol à 70% et la couronne enlevée à l'aide d'une fraise cylindrique diamantée stérile montée sur contre-angle rouge sous irrigation constante. Les tissus pulpaire exposés ont été délicatement séparés de la racine à l'aide d'une précelle dentaire stérile puis stockés dans un milieu de transport frais. Les pulpes isolées ont ensuite été transférées dans un poste de sécurité microbiologique (PSM) où elles ont été rincées dans 3 bains successifs d'HBSS (Hanks' balanced salt solution) (Dutscher, P04-32500) contenant 100 unités/mL de pénicilline, ainsi que 100 mg/mL de streptomycine pendant 5 min chacun. Les pulpes ont ensuite été coupées en fragments de 1 mm² avec un bistouri stérile. Les fragments obtenus ont été transférés dans un tube à centrifuger conique de 50 mL (Falcon) contenant une solution de 2,5 mg/mL de collagénase A (Sigma-Aldrich, 10103586001) et 4 mg/mL dispase II (Sigma-Aldrich, 4942078001). Afin de catalyser la digestion enzymatique, le tube à centrifuger conique a été placé dans un bain-marie à 37°C et agité toutes les 15 min pendant 2 h. La digestion a ensuite été arrêtée en ajoutant 10% (v/v) de FBS, puis les cellules ont été centrifugées à 300 g pendant 10 min. Le surnageant a été éliminé et le culot délicatement remis en suspension dans du MEM α complet c'est-à-dire du MEM α contenant 10% de FBS, 100 unités/mL de pénicilline, 100 mg/mL de streptomycine et 0,25 μ g/mL d'amphotéricine B (Gibco, 15290026). La suspension cellulaire obtenue a été filtrée avec un tamis

cellulaire de 70 μm (Falcon, 352350) puisensemencée dans une flasque de 25 cm^2 . La flasque a ensuite été observée quotidiennement et le milieu changé tous les 2 jours sans rinçage.

Lorsque les cellules ont commencé à former des clones proches de la confluence, le milieu a été éliminé, les cellules rincées avec du PBS puis trypsinisées pendant 3 min à 37°C. Après centrifugation à 300 g pendant 3 min, les cellules ont été incubées à 37°C et 5% de CO_2 dans des flasques de 75 cm^2 contenant du MEM α complet enrichi avec 1 ng/mL de bFGF (Gibco, PHG6015). Le milieu des flasques a été changé tous les 2 jours jusqu'à ce que les cellules atteignent 80% de confluence. Les cellules ont alors été rincées, trypsinisées, comptées dans une cellule de Neubauer, centrifugées puis remises en suspension dans du milieu de cryopréservation (PAN BIOTECH, P07-90050) de sorte à obtenir 1×10^5 cellules/mL. La solution ainsi obtenue a été placée dans des cryotubes à raison de 1 mL/tube immédiatement stocké à -80°C. Après une semaine à -80°C les cellules ont été transférées dans l'azote liquide.

3.2.2.2 Culture des DPSCs

Les DPSCs congelées entre leur premier et leur deuxième passage étaient remises en culture en injectant la solution fraîchement dégelée dans 12 mL de MEM α enrichi avec du bFGF préalablement réchauffé à 37°C. Le milieu était changé trois fois par semaine. Lorsque les cellules cultivées atteignaient 80-90% de confluence, elles étaientensemencées à 5×10^4 cellules dans une nouvelle flasque de 75 cm^2 ou utilisées pour l'expérience prévue. Les DPSCs ont été utilisées du 3^{ème} au 6^{ème} passage.

3.2.2.3 Caractérisation phénotypique des DPSCs

Le caractère souche des cellules isolées a été vérifié selon les critères établis par l'ISCT. Selon ces critères, les MSCs sont adhérentes au plastique, expriment à 95% ou plus les marqueurs de surface CD73, CD90 et CD105 et expriment à 2% ou moins les marqueurs de surface : CD14, CD11b, CD45, CD34, CD79a, CD19 et HLA-DR (Dominici *et al.* 2006). De plus, les MSCs sont capables de se différencier *in vitro* en lignées adipogènes, ostéogènes et chondrogènes (Dominici *et al.* 2006).

3.2.2.4 Cytométrie en flux

Les cellules isolées ont été caractérisées par cytométrie en flux au Laboratoire d'Immunologie Biologique du Nouvel Hôpital Civil de Strasbourg. Toutes les caractérisations ont été réalisées en étroite collaboration avec la Dre Béatrice Uring-Lambert, maître de conférences des universités et praticien hospitalier en immunologie.

Protocole

L'intégralité de la procédure de marquage a été réalisée au sein du Laboratoire d'Immunologie Biologique. Les DPSCs au 3^{ème} passage ont été trypsinisées selon le protocole habituel. Pour chaque analyse, les cellules ont été ajustées à 10^6 cellules/tube, puis centrifugées pendant 5 min à 300 g. Après élimination du surnageant, 5 μ L de chaque anticorps ont été ajoutés (Tableau 3). Les tubes ont été agités et incubés pendant 20 min à température ambiante dans l'obscurité. Les cellules ont ensuite été lavées avec 2 mL de solution, centrifugées, remises en suspension dans 0,3 mL de PBS. Pour chaque échantillon, le nombre de cellules marquées a été obtenu par cytométrie en flux (Cytomètre en flux Navios, Beckman Coulter). Lors de la première analyse, chaque marqueur de surface a été analysé séparément afin de régler les paramètres d'acquisition. Les paramètres enregistrés ont été ensuite utilisés pour toutes les cellules testées. Les données ont été analysées avec le logiciel Kaluza Analysis Software qui a permis de déterminer le pourcentage de cellules marquées (Beckman Coulter).

Anticorps anti-humains utilisés pour l'immunomarquage

Cible	Fluorochrome	Référence	Fournisseur
CD14	Krome Orange	B01175	Beckman Coulter
CD19	Krome Orange	A96418	Beckman Coulter
CD34	ECD	B49202	Beckman Coulter
CD45	FITC	A07782	Beckman Coulter
CD73	PE	B68176	Beckman Coulter
CD105	PC7	B43293	Beckman Coulter
CD146	PC5.5	FA1994-1	Beckman Coulter
HLA-DR	Orange Krome	B00070	Beckman Coulter

Tableau 3 : Liste des anticorps et des fluorochromes utilisés pour la cytométrie en flux.

3.2.2.5 Multidifférenciation *in vitro*

Le troisième critère défini par l'ISCT est la capacité des DPSCs à se différencier en cellules adipocytaires, chondrocytaires et ostéocytaires *in vitro*. Afin de vérifier le caractère souche des cellules isolées, trois protocoles de différenciation décrits dans des publications antérieures ont été mis en œuvre (Louvrier *et al.* 2018).

Différenciations adipogénique et ostéogénique

Les cellules ont étéensemencées à une densité de 1×10^4 cellules/cm² dans des plaques de 24 puits. Pour les différenciations adipogénique et ostéogénique, les cellules ont été cultivées dans 1 mL de milieu de différenciation adipocytaire (StemPro Adipogenesis Differentiation Kit ; Invitrogen, A1007001) ou 1 mL de milieu de différenciation ostéocytaire (StemPro Osteogenesis Differentiation Kit, Invitrogen, A1007201) par puit. Les cellules témoins ont également étéensemencées à la même densité dans 1 mL de milieu complet. Chaque milieu a été renouvelé deux fois par semaine. Après 3 semaines de culture à 37°C et 5% de CO₂, les cellules ont été lavées avec 1 mL de PBS, fixées avec 200 µL de paraformaldéhyde à 4% (PFA) (Merck, 4005) pendant 15 min à température ambiante puis lavées deux fois avec du PBS.

L'accumulation de gouttelettes de lipides à l'intérieur des cellules testées a été vérifiée par coloration des cellules pendant 15 min à température ambiante avec 300 µL de Oil Red O solution 0,5% (Sigma-Aldrich, O1391-250ML) diluée au tiers dans de l'eau distillée. Pour la différenciation ostéogénique, les cellules ont été colorées pendant 15 min à température ambiante avec 300 µL de rouge d'alizarine (Sigma-Aldrich, A5533-25G) dilué à 2% (v/v) dans de l'eau distillée (pH 4,2). Après coloration, les cellules ont été lavées trois fois à l'eau distillée et observées au microscope optique (Nikon Elipse TE200).

Différenciation chondrocytaire

La technique de la culture en culot a été utilisée pour induire la différenciation chondrocytaire des cellules étudiées (Ullah *et al.* 2012). 3×10^5 cellules ont étéensemencées dans des tubes de 15 mL contenant 1 mL de milieu chondrocytaire (StemPro Chondrogenesis Differentiation Kit ; Invitrogen, A1007101) ou 1 mL de MEM α complet pour l'expérience contrôle. Les tubes ont ensuite été centrifugés pendant 5 min à 300 g avant d'être incubés à 37°C et 5% de CO₂. Après 1 semaine de

culture, chaque culot a été transféré dans une plaque de culture de 24 puits et 1 mL de milieu de différenciation ou de MEM α complet ont été ajoutés. Les milieux ont été renouvelés deux fois par semaine. Après 3 semaines, la formation de protéoglycanes dans les culots a été vérifiée. Pour ce faire, les culots ont été lavés avec du PBS et les cellules fixées avec 200 μ L de PFA 4% pendant 15 min à température ambiante. Les culots ont ensuite été rincés deux fois avec de l'eau distillée, colorés pendant 30 min à température ambiante avec une solution de bleu alcian à 1% (Sigma-Aldrich, B8438) préparée dans du HCl à 0,1 M, lavés trois fois avec une solution de blanchiment (120 mL d'éthanol, 80 mL d'acide acétique) et observés avec un microscope optique (Nikon Elipse TE200).

3.2.3 Pré-conditionnement des DPSCs

Lors des expérimentations menées au cours de cette thèse, différents processus cellulaires ont été inhibés par incubation des DPSCs avec des drogues. En effet, le rôle de la dynamique du cytosquelette d'actine a été étudié en inhibant la myosine II par la blebbistatine, ROCK par Y27632, le complexe Arp2/3 par CK666 et la polymérisation de l'actine par la latrunculine. Par ailleurs, la décondensation de la chromatine a été provoquée grâce à l'inhibition des HDACs par de la TSA. Enfin, le transport nucléaire actif a été empêché par la Wheat Germ Agglutinin (WGA). Les temps d'incubation et les concentrations utilisées sont détaillés pour chaque drogue dans le tableau ci-dessous (Tableau 4). Toutes les drogues ont été achetées chez Sigma-Aldrich.

Drogues	Numéro de catalogue	Concentration	Durée d'incubation avant fixation	Durée d'incubation avant vidéomicroscopie
Blebbistatine	B0560	50 μ M	4 h	30 min
CK666	SML0006	200 μ M	4 h	30 min
Latrunculine A	L5163	1,2 μ M	4 h	30 min
TSA	T8552	50 nM,	12 h	12 h
Y27632	688000	50 μ M	4 h	30 min
WGA	L1882	25 μ g/mL	12 h	Non réalisé

Tableau 4 : Concentrations et durées d'incubation des drogues utilisées.

3.3 Expériences sur la prolifération par mesure de l'activité des phosphatases

La prolifération des DPSCs a été étudiée par mesure colorimétrique de l'activité des phosphatases. Le fonctionnement des phosphatases nécessitant l'utilisation d'ATP, elles ne peuvent être actives que dans les cellules vivantes non quiescentes. De plus, leur activité augmente proportionnellement au nombre de cellules viables. L'étude de la prolifération cellulaire par mesure de l'activité des phosphatases utilise le para-nitrophénylphosphate (pNPP) qui est un substrat de la plupart des phosphatases. L'hydrolyse de ce composé libère le p-nitrophénol, une substance transparente qui devient jaune en solution basique et dont le maximum d'absorption se situe à 405 nm (Jones *et al.* 1989).

Pour les expériences de prolifération cellulaire, les DPSCs ont étéensemencées sur les matrices E_G , $E_{2,5M}$, E_{28k} , E_{15k} et $E_{1,5k}$ à une densité de 5×10^4 cellules par condition et cultivées à 37°C et 5% de CO₂. Après 24, 48 et 72 h de culture, une solution de pNPP à 1 mg/mL a été préparée selon le protocole suivant : 5 mg de pNPP (Sigma-Aldrich, N9389) ont été dilués dans 5 mL d'une solution d'acétate de sodium à 0,1 M (pH 5,5) et 0,1% de X-Triton (Sigma-Aldrich, T8787). La solution obtenue a été chauffée dans un bain-marie à 37°C pendant 30 min pour permettre la dissolution complète du pNPP. Les cellulesensemencées sur chacune des matrices étudiées ont ensuite été rincées deux fois avec du PBS pour éliminer les cellules mortes et non adhérentes avant d'être incubées pendant 2,5 h à 37°C dans 600 µL de la solution de pNPP à 1 mg/mL. Après 2,5 h d'incubation, la réaction a été arrêtée en ajoutant 10 µL d'hydroxyde de sodium (NaOH) à 1 M dans chaque puit. Cette étape a entraîné l'apparition d'une coloration jaune due à la présence de para-nitrophénol. Après avoir transféré 200 µL de chaque solution dans une plaque de 96 puits, l'absorbance a été mesurée à 405 nm avec un spectrofluorimètre (SAFAS Xenius XC, Safas Monaco).

3.4 Microscopie par fluorescence

3.4.1 Protocole d'immunomarquage des cellules fixées

La visualisation au microscope d'une protéine d'intérêt peut être réalisée par son immunomarquage à l'aide d'un anticorps fluorescent. Généralement, les techniques d'immunomarquage utilisent un anticorps primaire, spécifiquement dirigé contre la protéine d'intérêt, suivi d'un anticorps secondaire couplé à un fluorochrome, dirigé contre le premier. Les protéines ainsi marquées peuvent être observées grâce à un microscope optique à épifluorescence.

Pour l'immunomarquage, les cellules étudiées ont étéensemencées sur des lamelles de verre de 12 mm de diamètre dans des plaques de 24 puits à une densité de 1×10^4 cellules/puit ou sur les matrices en PDMS à une densité de 5×10^4 cellules/condition. Après 24 h de culture, les cellules ont été fixées et perméabilisées pendant 15 min dans une solution de PFA à 3,7% (p/v), contenant 0,1% (v/v) de triton X-100 dilués dans du PBS. Après fixation, les cellules ont été incubées pendant une nuit dans 10% (v/v) de FBS dilué dans du PBS. Le lendemain, les cellules ont été rincées au PBS puis incubées avec un anticorps primaire pendant 1,5 h à température ambiante. La liste des anticorps utilisés dans cette thèse ainsi que leur dilution est donnée dans le tableau ci-dessous (Tableau 5). Après deux rinçages au PBS, les cellules ont été incubées avec l'anticorps secondaire spécifique de l'anticorps primaire utilisé (Tableau 6), pendant 30 min à température ambiante, à l'abri de la lumière. Les anticorps secondaires utilisés étaient tous couplés au fluorochrome Alexa Fluor 488 qui émet une fluorescence verte (longueur d'onde d'émission 525 nm). Après un rinçage au PBS, cet immunomarquage a été complété par deux marquages fluorescents. Premièrement, le noyau a été marqué pendant 15 min avec une solution colorée Hoechst 33258 (Sigma-Aldrich B288) à 5 $\mu\text{g/mL}$ qui émet une lumière bleu-cyan par fluorescence (longueur d'onde d'émission 461 nm). L'actine a ensuite été marquée pendant 15 min par une solution de phalloïdine couplée à l'Alexa Fluor 568 (2 $\mu\text{g/mL}$, Invitrogen, A12380) qui possède une très grande affinité pour les filaments d'actine et qui émet une lumière orange par fluorescence (longueur d'onde d'émission 603 nm).

Pour les observations sur verre, les lamelles ont été lavées au PBS avant d'être montées sur une lame porte-objet en présence de milieu de montage Vectashield (Vector Laboratories, H-100) avant observation au microscope à épifluorescence. Dans le cas des μ Dishes, les observations ont été effectuées dans du PBS sans montage supplémentaire.

Anticorps primaires	Provenance	Fournisseur	Numéro de catalogue	Dilution
RUNX2	Souris	Abcam	ab76956	1/50
Integrin β 1	Souris	Sigma-Aldrich	MAB2259Z	1/50
YAP	Souris	Santa Cruz	sc-101199	1/50
Integrin α 6	Rat	Abcam	ab105669	1/50
Vinculin (hVin-1)	Souris	Sigma-Aldrich	V9131	1/100

Tableau 5 : Liste des anticorps primaires utilisés.

Anticorps secondaires	Fluorophore	Fournisseur	Numéro de catalogue	Dilution
Chèvre anti-souris	Alexa Fluor 488	Invitrogen	A-11001	1/500
Chèvre anti-rat	Alexa Fluor 488	Abcam	ab150157	1/500

Tableau 6 : Liste des anticorps secondaires utilisés.

3.4.2 Quantification de la viabilité cellulaire

La survie des DPSCs a été évaluée sur les matrices E_G , $E_{2,5M}$, E_{28k} , E_{15k} et $E_{1,5k}$. Les cellules ont étéensemencées à une densité de 5×10^4 cellules/condition et cultivées à 37°C avec 5% de CO₂. Après 24 h de culture, les cellules ont été colorées à l'aide d'un kit de détection des cellules apoptotiques, nécrotiques et saines (PromoKine, PK-CA707-30018) conformément aux instructions du fabricant, puis observées par microscopie à fluorescence. Lors du traitement du dénombrement du nombre de cellules vivantes, nécrotiques et apoptotiques avec ImageJ, les 3 canaux, bleu, vert et rouge ont été superposés. Ce processus permet de visualiser le nombre de cellules total ainsi que le nombre de cellules colorées par une, deux ou trois couleurs.

3.4.3 Observations des cellules au microscope et paramètres mesurés

Les échantillons ont été imagés à l'aide d'un microscope Nikon Eclipse Ti-S disposant de 3 objectifs : $\times 10/0.3$ (Nikon, MRH00101) $\times 40/0.6$ (Nikon MRH08430) et $\times 60/1.4$ (MRD0605). L'objectif $\times 10$ a été utilisé lors des expériences de viabilité cellulaire et les objectifs $\times 40$ et $\times 60$ ont servi à l'observation des cellules immunomarquées. Les images ont été réalisées à l'aide d'un appareil photographique numérique Nikon (CDD Nikon Digital Sight DS-U3), acquises via un logiciel dédié (NIS-Elements) et traitées avec ImageJ.

3.4.4 Paramètres analysés

3.4.4.1 Quantification des aires nucléaires et cellulaires

L'aire cellulaire a été mesurée à partir des images obtenues après immunomarquage des cellules par l'anticorps anti-vinculine. Après avoir paramétré l'échelle ($0,11 \mu\text{m}/\text{pixel}$), le contour de 20 à 30 cellules a été tracé par l'observateur, permettant le calcul de l'aire du noyau de la cellule par ImageJ. L'aire nucléaire a été mesurée selon le même protocole, à partir des images montrant la fluorescence du colorant Hoechst 33258. Les résultats obtenus sont exprimés en μm^2 .

3.4.4.2 Quantification de la longueur des spots de vinculine

La longueur des spots de vinculine a été mesurée avec le logiciel ImageJ en mesurant la longueur de 20 contacts de vinculine par cellule. Pour chacune des 20 à 30 cellules étudiées par condition, la longueur moyenne des spots de vinculine a été déduite des valeurs mesurées. Les résultats obtenus sont exprimés en μm .

3.4.4.3 Quantification de l'intensité de YAP

La quantification de l'intensité de la fluorescence correspondant au signal de YAP a été réalisée avec ImageJ. Pour chaque cellule, l'intensité de la fluorescence a été mesurée sur une zone de 20 pixels cytoplasmiques et sur une autre de 20 pixels nucléaires. Les intensités de fluorescence nucléaire et cytoplasmique ont été établies en estimant la moyenne des 20 valeurs mesurées. Le rapport nucléocytoplasmique de YAP a été calculé en divisant la moyenne des intensités nucléaires par la moyenne des intensités cytoplasmiques pour 20 à 30 cellules par condition.

3.4.4.4 Quantification de la viabilité cellulaire

La quantification des cellules saines et des cellules mortes a été réalisée après superposition des canaux DAPI, Texas Red et GFP par ImageJ grâce au plugin « Cell Counter ». Les cellules étaient considérées comme saines si elles étaient uniquement marquées par le colorant Hoechst 33342. Les cellules étaient considérées comme mortes si un marquage par l'AnnexinV-FITC (cellules apoptotiques) ou l'EthD-III (cellules nécrotiques) était observé, qu'il soit superposé ou non au marquage par Hoechst 33342. Les résultats obtenus sont exprimés en pourcentage de cellules saines. Ce pourcentage a été calculé pour chaque champ capturé en divisant le nombre de cellules saines par la somme des cellules dans ce champ. Pour chaque expérience, le pourcentage de viabilité cellulaire a été déterminé en estimant la moyenne des pourcentages de cellules saines de tous les champs analysés.

3.5 Microscopie électronique en transmission

3.5.1 Préparation des échantillons

La microscopie électronique en transmission a été utilisée pour quantifier la condensation de la chromatine en fonction de la rigidité de la matrice et des drogues étudiées.

Les DPSCs ont étéensemencées sur les matrices E_G , $E_{2,5M}$, E_{28k} , E_{15k} et $E_{1,5k}$ à une densité de 1×10^5 cellules/condition et cultivées à 37°C avec 5% CO_2 . Après 1 semaine de culture, les cellules ont été rincées dans un tampon 125 mM de cacodylate (pH 7,4) puis fixées 2 h à température ambiante dans une solution de PFA 2%-glutaraldéhyde 2% réalisée dans un tampon de cacodylate à 50 nM (pH 7,4).

La deuxième fixation a ensuite été réalisée par une solution de tétr oxyde d'osmium à 1% dans un tampon cacodylate à 125 mM pendant 30 min à température ambiante. Après deux lavages de 10 min dans une solution tampon de cacodylate 125 mM, les échantillons ont été déshydratés par immersion dans des solutions présentant des concentrations d'éthanol croissantes (50, 70, 95 et 100%) L'échantillon a été laissé 15 min dans chacun des trois premiers bains. Le bain d'éthanol à 100% a par ailleurs été renouvelé trois fois pendant 20 min.

Les échantillons ont ensuite été inclus dans la résine époxy pendant 2 h puis polymérisés pendant 48 h à 60°C. Après la polymérisation de la résine, un choc thermique a été effectué pour enlever les lamelles de verre et permettre aux échantillons d'être coupés. Dans le cas des cellulesensemencées sur des matrices PDMS, la lame et le PDMS ont été enlevés par arrachage. Des coupes transversales de cellules de 100 nm d'épaisseur ont été obtenues à l'aide d'un ultramicrotome automatique (Ultracut-E Ultramicrotome, Reichert Jung, USA). Les sections contenant le plan médian du noyau avec le nucléole ont été sélectionnées pour les observations. Les sections ont été colorées par l'acétate d'uranyle à 5% pendant 20 min et par une solution de citrate de plomb 4% pendant 10 min.

3.5.2 *Acquisition*

Les échantillons ont été observés au MET EM208 (FEI Compagny, Philips, Pays-Bas) fonctionnant avec une tension d'accélération de 70 kV. Les images ont été capturées sur des films argentiques Kodak SO-163 avec un temps d'exposition de 1 s. Ces images ont été révélées ultérieurement à l'aide d'un révélateur Kodak D19, fixées au Superfix Plus (Tetenal) puis numérisées à l'aide d'un scanner à 600 dpi.

3.5.3 *Analyses morphologiques*

La quantification du pourcentage d'hétérochromatine contenu dans les noyaux a été réalisée sur les images capturées au MET en utilisant une méthode décrite précédemment (Rabineau *et al.* 2015). Environ 20 noyaux de cellules ont été analysés en vue de déterminer la proportion d'hétérochromatine dans les noyaux.

3.6 Vidéomicroscopie

La vidéomicroscopie permet d'étudier la dynamique d'un échantillon biologique sur des périodes de temps étendues. Afin de réaliser l'observation des micro-organismes ou des cellules dans des conditions adaptées, les expériences de vidéomicroscopie sont effectuées dans une enceinte permettant la régulation du niveau de CO₂, de l'humidité, du pH et de la température. Un microscope optique motorisé associé à une caméra sont placés à l'intérieur de cette enceinte. Ils permettent de changer les cubes filtres, allumer la source fluorescente et la lampe halogène, déplacer l'échantillon et capturer les images selon des schémas définis par l'opérateur lors du lancement de l'expérience.

3.6.1 Préparation des échantillons

Des expériences de vidéomicroscopie ont été réalisées pour mesurer la vitesse moyenne de migration et la persistance des DPSCs et des NIH 3T3. Ces paramètres ont d'abord été mesurés sur les DPSCs et les NIH 3T3 ensemencées sur les matrices E_G , $E_{2,5M}$, E_{28k} , E_{15k} et $E_{1,5k}$ puis sur les matrices PDMS birigidités. Par ailleurs, la migration des DPSCs a été étudiée lorsque la dynamique de l'actine était inhibée par la blebbistatine, Y27632, la CK666 ou la latrunculine. Enfin, une dernière série d'expériences a consisté à observer la migration cellulaire lorsque la chromatine était maintenue ouverte par la TSA.

Pour les observations sur les matrices E_G , $E_{2,5M}$, E_{28k} , E_{15k} et $E_{1,5k}$, les DPSCs et les NIH 3T3 ont été ensemencées à une densité de 3×10^4 cellules/condition et cultivés pendant 24 h en incubateur. Si l'expérience impliquait la décondensation de la chromatine par la TSA, cette dernière était ajoutée dans les échantillons 12 h avant le début de la microscopie. Une heure avant le transfert des échantillons au microscope, les noyaux cellulaires étaient marqués au Hoechst 33342 (5 µg/mL) pendant 20 min. Si d'autres drogues étaient nécessaires, elles étaient ajoutées immédiatement après le rinçage du Hoechst selon les concentrations indiquées dans le tableau 4 et laissées pendant toute la durée de l'expérience. 30 min après la fin de la coloration au Hoechst et éventuellement le préconditionnement des cellules par des drogues, les échantillons étaient transférés au microscope.

Lorsqu'elles étaient observées sur des matrices PDMS birigidités, les DPSCs et les NIH 3T3 étaient ensemencées à une densité de 8×10^4 cellules/condition et cultivées pendant 6 h dans des plaques de 6 puits. Le temps d'incubation était volontairement diminué afin d'imager les échantillons immédiatement après l'adhésion cellulaire et pouvoir ainsi observer les cellules à la frontière des deux PDMS migrer vers l'une des deux zones. Après marquage et éventuellement prétraitement des échantillons, les lames de verre étaient transférées sur un support adapté à l'imagerie et recouvertes par 1,5 mL de milieu. Ce milieu était ensuite recouvert par 1 mL d'huile minérale (Sigma-Aldrich, M5310) afin d'éviter l'évaporation du milieu de culture.

3.6.2 Acquisition

Les expériences de vidéomicroscopie ont été réalisées grâce à un microscope Nikon Ti-E équipé d'un Objectif 10× (Nikon CFI Plan Fluor) et d'une caméra Andor Zyla sCMOS pilotés par le logiciel Nikon NIS-Elements Ar. Les images ont été acquises toutes les 10 min pendant 24 h simultanément en contraste de phase et en DAPI. Pour les matrices E_G , $E_{2,5M}$, E_{28k} , E_{15k} et $E_{1,5k}$ les champs étaient sélectionnés en évitant les bords de l'échantillon et les zones où la densité cellulaire était trop élevée. Pour les matrices PDMS birigidités, les champs ont été localisés au voisinage de la jonction entre le PDMS mou et le PDMS dur.

3.6.3 Analyse des données

Le suivi des cellules a été réalisé grâce au logiciel "NIS-Elements Ar 3D tracking" (Nikon). Pour chaque expérience, les contrastes ont été ajustés et un seuillage réalisé afin de permettre la détection automatique des cellules. Les cellules identifiées ont ensuite été suivies sur toute la durée de l'expérience, soit 24 h. Un contrôle visuel a permis l'élimination des cellules nécrosées ou en division. Pour chaque cellule, la vitesse moyenne et la persistance ont été déterminés par le logiciel « NIS-Elements Ar 3D tracking ». La persistance est définie comme distance le rapport entre la distance séparant les points de départ et d'arrivée sur la longueur totale

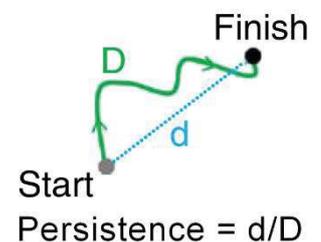


Figure 4 : Définition de la persistance (Adapté de Gorelik et Gautreau 2014).

parcourue (Figure Pour chaque expérience de vidéomicroscopie, 100 à 200 cellules ont été suivies sur les matrices E_G , $E_{2,5M}$, E_{28k} , E_{15k} et $E_{1,5k}$ et une trentaine de cellules sur les matrices PDMS birigidités.

3.7 *Analyses statistiques*

Chaque expérience a été répétée au moins trois fois. Les données sont présentées sur les graphiques sous forme de moyenne \pm erreur sur la moyenne (Standard error on the mean : SEM). L'analyse statistique et les graphiques ont été réalisés avec SigmaPlot (version 12.5, Systat Software, Inc). La signification statistique de la différence des moyennes de deux groupes a été déterminée à l'aide du test de Student, ou test t . Lorsque les résultats étaient normalisés, par exemple pour la survie ou la prolifération cellulaire, le test de la somme des rangs de Wilcoxon a été utilisé. Enfin, l'analyse de la variance (analysis of variance : Anova) a été utilisée pour déterminer la signification statistique de la différence entre les moyennes de trois groupes ou plus. Pour chaque expérience, le test statistique utilisé est indiqué dans la légende de la figure. La valeur $p < 0,05$ a été considérée comme indiquant une différence statistiquement significative et est notée « * » sur les graphiques.

Chapitre 4. A New Combination with D-Cateslytin to Eradicate Root Canal Pathogens

4.1	Introduction	88
4.2	Article	90
4.3	Résumé	100

4.1 Introduction

L'un des principaux objectifs de l'ingénierie tissulaire dentaire est la régénération du complexe pulpo-dentinaire et le rétablissement de la fonction pulpaire afin de prolonger la survie des dents sur l'arcade. Une étude clinique récente a montré qu'il était possible de régénérer des tissus pulpaire fonctionnels chez des patients présentant des atteintes pulpaire irréversibles (Nakashima *et al.* 2017). Néanmoins, deux des cinq dents traitées dans cette étude présentaient des signes de complications après le traitement. En effet, une des dents traitées n'a pas montré de signe de revascularisation tandis qu'une autre a développé des signes d'infection périapicale (Nakashima *et al.* 2017).

Ces résultats, quoique très encourageants, soulignent l'importance du contrôle de l'infection bactérienne lors du traitement endodontique initial et de la phase de temporisation. Dans cette étude, 3 à 12 semaines ont été nécessaires entre l'extirpation des tissus pulpaire inflammés et l'autotransplantation des DPSCs préalablement isolées (Nakashima *et al.* 2017). Bien que la désinfection chimiomécanique réalisée pendant le traitement endodontique soit efficace pour réduire le nombre de micro-organismes canalaire, elle ne peut pas complètement éliminer les agents pathogènes du canal radiculaire (Haapasalo *et al.* 2005). Par conséquent, si le canal est laissé vide entre deux étapes thérapeutiques, les bactéries résiduelles peuvent se multiplier et atteindre des niveaux similaires à ceux observés au début du traitement (Mohammadi et Dummer 2011). Des médications intracanaire avec une action antimicrobienne pourraient être utilisées pour éviter la prolifération bactérienne entre la mise en forme canalaire et la transplantation des DPSCs autologues.

Actuellement, l'hydroxyde de calcium est la médication intracanaire la plus couramment utilisée. Néanmoins, certains pathogènes endodontiques, en particulier *Enterococcus faecalis*, ont la capacité de résister à cette médication (Evans *et al.* 2002). Dans ce contexte, l'utilisation d'agents antimicrobiens capables d'éliminer les espèces résistantes des canaux radiculaires et de moduler la réponse inflammatoire immunitaire périapicale pourrait améliorer le taux de réussite des traitements endodontiques (Lima *et al.* 2015).

Les peptides antimicrobiens (Antimicrobial peptides : AMPs) constituent la première ligne de défense contre les infections dans la plupart des organismes vivants. Ils font partie de la réponse immunitaire innée et sont libérés dans la circulation peu après une infection (Radek *et al.* 2008). Les études à leur sujet ont montré qu'ils présentaient plusieurs avantages majeurs par rapport aux

antibiotiques conventionnels. En effet, les AMPs sont capables d'éliminer rapidement un large spectre de micro-organismes et de moduler la réponse immunitaire (Zhang et Gallo 2016). De plus, les AMPs provoquent moins de résistances bactériennes que les antibiotiques conventionnels et ne sont pas toxiques pour les cellules de l'hôte. (Zaet *et al.* 2017). Dans ce contexte, les AMPs constituent d'excellents candidats pour éviter la prolifération bactérienne lors des phases de temporisation au cours d'un traitement endodontique.

Parmi les nombreux AMPs décrits dans la littérature, les AMPs dérivés de la chromogranine A (CgA) ont, en plus des caractéristiques décrites précédemment, l'intérêt d'être courts, donc simples à synthétiser, et stables à des pH et températures variés (Aslam *et al.* 2012). Il a récemment été montré au sein de l'UMR 1121 qu'en substituant tous les acides aminés L de la Cateslytine-L, un AMP dérivé de la CgA, par des acides aminés D, la Cateslytine-D (D-Ctl) obtenue présentait une efficacité antimicrobienne augmentée contre plusieurs pathogènes oraux, tels que *Parvimonas micra*, *Prevotella intermedia*, *Fusobacterium nucleatum* et *Candida albicans* (Zaet *et al.* 2017, Darteville *et al.* 2018).

Dans cette étude, nous avons montré que la D-Ctl, contrairement aux peptides naturels dérivés de la CgA et à l'hydroxyde de calcium, était efficace contre *E. faecalis*. Nous avons ensuite montré que la combinaison de la D-Ctl et de l'hydroxyde de calcium était stable, améliorait les propriétés antimicrobiennes de ce dernier et n'était pas toxique pour les fibroblastes gingivaux humains. Les résultats sont présentés sous la forme de l'article ci-dessous, publié en 2019 dans l'International Journal of Peptide Research and Therapeutics.

4.2 Article

A New Combination with D-Cateslytin to Eradicate Root Canal Pathogens

Claire Ehlinger^{1,2,3}  · Pauline Dartevelle^{1,2,3} · Abdurraouf Zaet^{1,2,3} · Yoshihito Kurashige⁴ · Youssef Haïkel^{1,2,3} · Marie-Hélène Metz-Boutigue^{1,3} · Céline Marban^{1,2,3}

Accepted: 10 August 2019
© Springer Nature B.V. 2019

Abstract

The success of endodontic treatments depends on the elimination of intracanal pathogens. Since irrigation and instrumentation can only partially eliminate bacteria, the use of intracanal medicaments is suggested to improve the eradication of the root canal pathogens. Antimicrobial peptides derived from Chromogranin A display bacteriolytic activities and are potentially excellent candidates to be combined with conventional intracanal medicaments. In this study, we combined D-Cateslytin (D-Ctl), together with calcium hydroxide (Ca(OH)₂) to test for enhanced antimicrobial properties against *Enterococcus faecalis*. Antimicrobial activities were determined by broth dilution assays, stability of D-Ctl was assessed by HPLC and MTT tests were used to evaluate cytotoxicity. A saturated solution of Ca(OH)₂ (1.7 mg/mL) was able to inhibit 58% (\pm 5%) of *E. faecalis* growth, while the combination of both 0.85 mg/mL of Ca(OH)₂ and 1/2 MIC of D-Ctl was able to fully inhibit its growth. D-Ctl was stable against the proteases secreted by *E. faecalis* and showed no toxicity on human gingival fibroblasts. Besides *E. faecalis*, this combination was also effective in completely killing other endodontic pathogens: *Parvimonas micra*, *Prevotella intermedia*, *Fusobacterium nucleatum* and *Candida albicans*. In conclusion, D-Ctl combined with Ca(OH)₂ eradicates several endodontic pathogens and could be used as an innovative intracanal medicament to reduce endodontic failures.

Keywords Antimicrobial peptides · Calcium hydroxide · D-Cateslytin · *Enterococcus faecalis* · Endodontic pathogens

Introduction

Apical periodontitis (AP) is a common pathology, defined as an inflammatory process around the apex of a root, causing pain and resorption of periradicular structures (Persoon and Özok 2017). AP affects all populations with a varying prevalence. A recent review showed that AP concerned 7% of individuals in a Spanish population to 86% in a Croatian population, with a median of 52.5%. (Persoon and Özok 2017). Since a correlation between endodontically treated

teeth (Joshiyura et al. 2006; Caplan et al. 2009) or chronic AP (Caplan et al. 2006) and adverse cardiovascular effects has been proposed, it is essential to treat teeth with AP.

The fundamental role of bacteria within the pulp space in the development, expansion and maintenance of AP has been widely demonstrated (Nair 2006; Peciuliene et al. 2008; Siqueira and Rocas 2009; Ricucci and Siqueira 2010). Endodontic treatment aims to improve periapical health by removing the root canal pathogens (Trope and Bergenholz 2002; El Karim et al. 2007). Although the chemomechanical preparation realized during endodontic treatment is effective in reducing the number of microorganisms, it cannot completely eliminate pathogens from the root canal (Byström and Sundqvist 1981; Haapasalo et al. 2005). Therefore, if the canal is left empty between appointments, the remaining bacteria can multiply and reach levels similar to the beginning of treatment (Byström and Sundqvist 1981; Sjogren et al. 1997; Mohammadi and Dummer 2011). To overcome this problem, the use of intracanal medicaments with antimicrobial properties is recommended to fill the root canal

✉ Claire Ehlinger
cehlinger@unistra.fr

¹ Inserm UMR 1121, Biomatériaux et Bioingénierie, 11, rue Humann, 67000 Strasbourg, France

² Faculté de Chirurgie Dentaire, Université de Strasbourg, 3 rue Sainte Elisabeth, 67000 Strasbourg, France

³ Fédération de Médecine Translationnelle de Strasbourg, 11, rue Humann, 67000 Strasbourg, France

⁴ Health Sciences University of Hokkaido, Kanazawa 1757, Ishikari-Tobetu, Hokkaido 061-0293, Japan

between treatment sessions (Mohammadi and Dummer 2011; Gupta et al. 2015).

Currently, calcium hydroxide ($\text{Ca}(\text{OH})_2$) is the most commonly used intracanal medicament. $\text{Ca}(\text{OH})_2$ is commercially available as pastes containing various vehicle. Its concentrations in these pastes vary from 0.85 g/mL to 1.7 g/mL (Fava and Saunders 1999).

The popularity of $\text{Ca}(\text{OH})_2$ is due to its antimicrobial effect against Gram-positive, Gram-negative bacteria and fungi from the root canal (Law and Messer 2004; Mohammadi and Dummer 2011; Mohammadi et al. 2012). These antimicrobial properties are related to the release of hydroxyl ions, which increase the pH within the root canal and directly affect the cell membrane and proteins structure of microorganisms (Mohammadi and Dummer 2011; Mohammadi et al. 2012). Indeed, the high pH of $\text{Ca}(\text{OH})_2$ modifies the integrity of the cytoplasmic membrane through denaturation of proteins and destruction of phospholipids or unsaturated fatty acids. These chemical modifications may be due to peroxidation process (Mohammadi et al. 2012).

Among the numerous endodontic pathogens, *Enterococcus faecalis* is one of the microorganisms often recovered in root canal with persistent infections (Rocas et al. 2004; Stuart et al. 2006). It is a Gram-positive bacterium able to invade dentinal tubules (Love 2001) and to resist very harsh environmental conditions (starvation, acidic and alkaline pH) (Evans et al. 2002; McHugh et al. 2004), especially by maintaining pH homeostasis (Figdor et al. 2003; Stuart et al. 2006). Because *E. faecalis* has shown resistance to $\text{Ca}(\text{OH})_2$ (Evans et al. 2002), its association with other antimicrobial agents was proposed (Mohammadi and Dummer 2011).

In our laboratory, since several years, we have identified antimicrobial peptides (AMPs) derived from the processing of Chromogranin A (CgA) (Aslam et al. 2012). These AMPs are part of the innate immune response and are released into the circulation shortly after an infection (Radek et al. 2008). They are short, stable in a wide range of pH and temperature and not toxic for host cells (Aslam et al. 2012). Furthermore, they display bacteriolytic activity against a broad spectrum of pathogens, including oral microorganisms, play a crucial role in modulating the immune response (Lugardon et al. 2001; Briolat et al. 2005; Aslam et al. 2012, 2013; Zaet et al. 2017) and induce less resistance than antibiotics (Zaet et al. 2017). We recently observed that by substituting all L-amino acids from Cateslytin, one of the CgA-derived AMPs, with D-amino acids, we could generate D-Ctl, which has improved antimicrobial efficiency against several oral pathogens such as *Parvimonas micra*, *Prevotella intermedia*, *Fusobacterium nucleatum* and *Candida albicans* (Zaet et al. 2017; Dartevelle et al. 2018).

In the present study, we analyzed the activity of several CgA-derived peptides including Chromofungin (CHR), Catestatin (CAT) and the L- and D-form of its active domain,

the Cateslytin (D-Ctl and L-Ctl), against *E. faecalis*. We then combined D-Ctl with $\text{Ca}(\text{OH})_2$ to improve its antimicrobial efficiency and develop a new stable, non-toxic combination therapy efficient against endodontic pathogens, including *E. faecalis*.

Materials and Methods

Antimicrobial Agents

The following peptides were purchased from Proteogenix: CHR (bCgA₄₇₋₆₆: RILSILRHQNLKELQDLAL), CAT (bCgA₃₄₄₋₃₆₄: RSMRLSFRARGYGFRGPGQLQL), L-Ctl and D-Ctl (bCgA₃₄₄₋₃₅₈: RSMRLSFRARGYGFR).

Preparation of $\text{Ca}(\text{OH})_2$ Solutions

$\text{Ca}(\text{OH})_2$ was purchased from Sigma-Aldrich. A saturated solution of $\text{Ca}(\text{OH})_2$ (1.7 mg/mL) was diluted to 1/2 (0.85 mg/mL) and 1/4 (0.425 mg/mL). $\text{Ca}(\text{OH})_2$ was diluted in milli-Q water, Anaerobe Basal Broth, Sabouraud medium or Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM F12, Dutscher) depending on the experiment performed.

Microorganisms and Mammalian Cell Line

Fusobacterium nucleatum (ATCC® 49256TM), *Prevotella intermedia* (ATCC® 49046TM), and *Parvimonas micra* (ATCC® 33270TM) were purchased from ATCC. *Enterococcus faecalis* (CCM 2541) was obtained from the Czechoslovak Collection of Microorganisms. Bacteria were cultured in Anaerobe Basal Broth (Oxoid) at 37 °C in anaerobic conditions. *Candida albicans* (ATCC® 10231TM) was cultured in Sabouraud medium (Becton–Dickinson, Germany), supplemented with tetracycline (10 µg/mL; Sigma Aldrich) and cefotaxime (10 µg/mL; Sigma Aldrich).

Human gingival fibroblasts (HGF-1; ATCC® CRL-2014TM) were commercially obtained from ATCC and cultured at 37 °C and 5% CO_2 in DMEM F12 (Dutscher) supplemented with 10% (v/v) fetal bovine serum (FBS, Gibco), 100 units/mL penicillin and 100 µg/mL streptomycin (Thermo Fisher Scientific).

Broth Dilution Assays

An overnight culture of each pathogen was diluted ($\text{OD}_{600\text{nm}} = 0.001$) and incubated at 37 °C in 96-plates in the presence of different concentrations of antimicrobial agents. After 24 h incubation, the $\text{OD}_{600\text{nm}}$ was evaluated with a spectrophotometer (Multiskan EX, Thermo Fisher Scientific).

Determination of the Minimal Inhibitory Concentration (MIC)

The MIC, defined as the lowest concentration of peptide able to inhibit 100% of the inoculum, was calculated using a modified Gompertz model as described by Lambert and Pearson (2000).

Cytotoxicity Assays

The cytotoxicity of the antimicrobial agents was examined by MTT [3(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5 diphenyl tetrazolium bromide] assays (Sigma Aldrich) using HGF-1 cells as a model. HGF-1 cultured in DMEM F12 (Dutcher) supplemented with 10% FBS (Gibco), 100 units/mL penicillin and 100 µg/mL streptomycin (Thermo Fisher Scientific) were incubated at 37 °C and 5% CO₂ for 24 h in a 96-wells plate before being treated with various concentrations of Ca(OH)₂ alone or supplemented with D-Ctl. Untreated cells were used as a control. After 24 h, 48 h and 72 h incubation, cells were carefully washed with phosphate-buffered saline (PBS) and treated with MTT at a final concentration of 0.25 mg/mL. HGF-1 cells were then incubated for 2 h at 37 °C before being lysed with isopropanol/HCl (48:2, v/v). Cell viability was assessed by reading the OD_{540nm} with a Multiskan EX microplate spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific).

Stability Assays of D-Ctl in the Supernatant of *E. faecalis*

The supernatant of *E. faecalis* was prepared as follows: a single colony of *E. faecalis* was suspended in 5 mL of Anaerobe Basal Broth and incubated at 37 °C overnight. The culture was centrifuged at 10,000×g for 1 min and filtered (Millex GV filter unit 0.22 µm, Millipore SAS). The supernatant (1 mL) was then incubated at 37 °C for 24 h with D-Ctl (300 µg). As controls, bacterial supernatant (1 mL) and D-Ctl (300 µg) diluted in milli-Q water (1 mL) were incubated separately in similar conditions.

The samples (1 mL) were analyzed by HPLC (Dionex, Ultimate 3000) using a Nucleosil reverse-phase 300-5C18-column (4.6 × 250 mm; particle size: 5 µm; porosity, 300 Å) (Macherey–Nagel). The two solvents used were: 0.1% (v/v) Trifluoroacetic acid (TFA) in water (solvent A) and 0.09% (v/v) TFA in 70% (v/v) acetonitrile–water (solvent B). Absorbance was measured at 214 nm (A_{214nm}). The flow rate for elution was 0.7 mL/min with a gradient of solvent B as indicated on the chromatograms. For each sample, material (1 mL) was directly injected on the HPLC column.

Stability Assays of D-Ctl in Ca(OH)₂

D-Ctl (156 µg or 78 µg) corresponding to MIC or ½ MIC was incubated in 1 ml of a Ca(OH)₂ solution (1.7 mg/mL or 0.85 mg/mL) at 37 °C for 24 h. The pH of the solution was buffered with HCl to be the same as for the broth dilution assays and MTT tests (pH 9). As a control, D-Ctl (156 µg or 78 µg) was also incubated in milli-Q water (1 mL) at 37 °C for 24 h. The samples (1 mL) were analyzed by HPLC as previously reported.

Statistical Analysis and Graphs

Each assay was done at least in triplicate. For broth dilution and cytotoxicity assays, data are presented as mean ± standard deviation. Statistical analysis was performed using SigmaPlot (release 12.5, Systat Software, Inc). Statistical significance between two groups was determined using the Mann–Whitney Rank Sum Test or the *t*-test. Statistical significance between three groups or more was determined using the Kruskal–Wallis one-way analysis of variance on ranks. Two-way analysis of variance was used when the experimental setups involved two independent variables. For each experiment, the statistical test used is indicated in the figure legend. *p*-values < 0.05 were considered statistically significant and noted by * on the graphs. Artworks were created using SigmaPlot (release 12.5, Systat Software, Inc).

Results

Antibacterial Assays of Solution of Ca(OH)₂

In a preliminary experiment, the efficiency of a saturated solution of Ca(OH)₂ (1.7 mg/mL, pH 9) was assessed by broth dilution assays on *E. faecalis* and *F. nucleatum*. Our results confirmed previous studies showing that a saturated solution of Ca(OH)₂ could not completely inhibit the growth of *E. faecalis* (Ferreira et al. 2007). In our hands, the inhibition rate was only 58% (± 5%). In addition, as previously described (Ferreira et al. 2007), we confirmed that a saturated solution of Ca(OH)₂ was able to inhibit 100% (± 1%) of *F. nucleatum* growth (Fig. 1).

Antibacterial Activity of Several CgA-Derived Peptides Against *E. faecalis*

We then tested the antibacterial activity of several CgA-derived peptides such as Chromofungin (CHR), Catestatin (CAT) and Cateslytin (L-Ctl or D-Ctl) against *E. faecalis* using broth dilution assays (Fig. 2). All peptides were tested at 200 µg/mL. Our results demonstrated that no natural peptides derived from CgA (CHR, CAT and L-Ctl) display

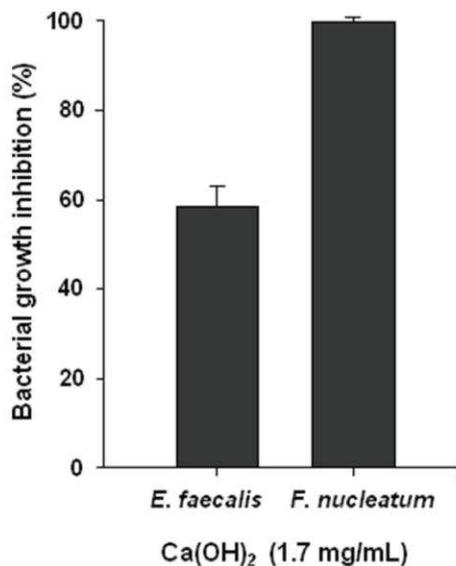


Fig. 1 Inhibition of *E. faecalis* (n=9) and *F. nucleatum* (n=3) growth by a saturated solution of Ca(OH)₂

antimicrobial activity against *E. faecalis*. In contrast, D-Ctl was able to achieve bacterial growth inhibition (Fig. 2a). Its MIC on *E. faecalis*, determined by using the Gompertz model, was evaluated to 156 µg/mL (Fig. 2b). D-Ctl was therefore chosen as the best candidate to combine with Ca(OH)₂.

D-Ctl is Stable in a Saturated Solution of Ca(OH)₂

The stability of D-Ctl at the MIC in a saturated solution of Ca(OH)₂ (1.7 mg/mL, pH 9) was assessed by HPLC (Fig. 3a). Under our experimental conditions, D-Ctl was eluted after 38 min (Fig. 3a, chromatogram 1). The same peak was identified in a saturated solution of Ca(OH)₂, suggesting that D-Ctl at the MIC remains stable under these conditions. The shoulder in the peak corresponds to an oxidized form (oxidation of methionine residue) of D-Ctl. Indeed, the first major peak is the oxidized D-Ctl and the second one to the non-oxidized form (Fig. 3a, chromatogram 2). The areas under the curves were calculated in three independent experiments for each condition. The ratio of areas under the curve of chromatogram 2 to chromatogram 1 was 1.01 ± 0.12 .

D-Ctl Remains Stable in the Supernatant of *E. faecalis*

The stability of D-Ctl in the supernatant of *E. faecalis* was assessed by HPLC (Fig. 3b). In our experimental conditions, D-Ctl in milli-Q water was eluted at 38 min (Fig. 3b, chromatogram 1). The same peak was still observed when D-Ctl

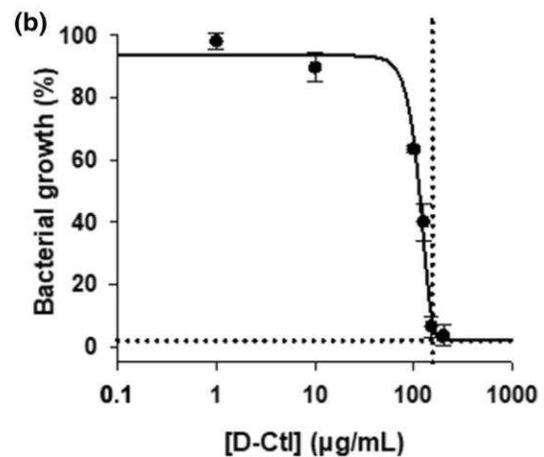
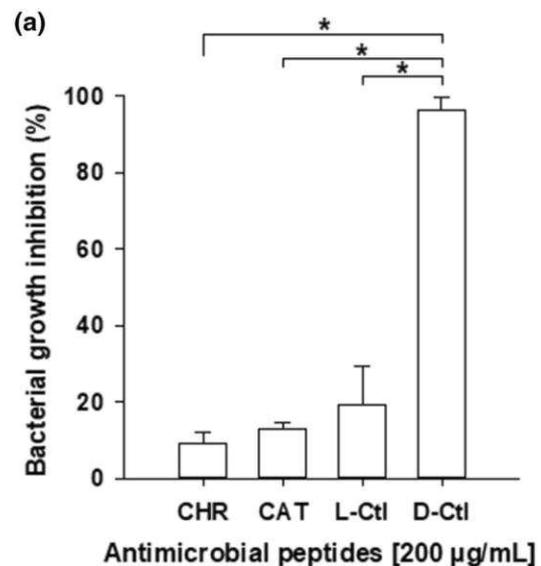


Fig. 2 Activity of antimicrobial CgA-derived peptides against *E. faecalis*. **a** Antimicrobial activity of CgA-derived peptides at 200 µg/mL against *E. faecalis*. For CHR, CAT and L-Ctl n=3 and for D-Ctl n=9. Statistical significance was determined by a Kruskal–Wallis one-way analysis of variance on ranks ($p=0.007$ indicated by “*”). **b** Determination of the MIC (156 µg/mL) of D-Ctl against *E. faecalis* using a modified Gompertz model

was incubated with the bacterial supernatant (Fig. 3b, chromatogram 2). The areas under the curves were calculated in three independent experiments for both conditions. The ratio of areas under the curve of chromatogram 2 to chromatogram 1 was 0.97 ± 0.04 . The chromatogram 3 represents the bacterial supernatant alone (Fig. 3b, chromatogram 3). Notably, the other peaks on the chromatograms 2 and 3 correspond to proteins included in the media and the proteases secreted by the bacteria. In conclusion, D-Ctl is resistant to the degradation by the virulence factors of *E. faecalis*, allowing a prolonged action of the peptide against this pathogen.

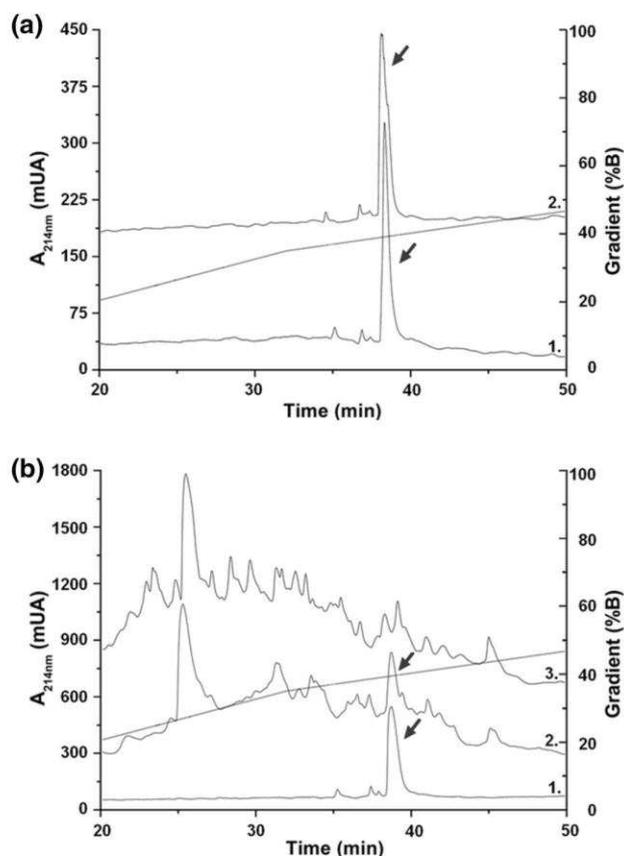


Fig. 3 Stability of D-Ctl in a saturated solution of $\text{Ca}(\text{OH})_2$ and in the supernatant of *E. faecalis*. **a** The chromatograms 1 and 2 correspond to D-Ctl diluted in milli-Q water and D-Ctl diluted in a saturated solution of $\text{Ca}(\text{OH})_2$ (pH 9), respectively. A black arrow indicates presence of D-Ctl. **b** The chromatograms 1, 2 and 3 correspond to D-Ctl diluted in milli-Q water, D-Ctl diluted in the supernatant of *E. faecalis* and the supernatant of *E. faecalis* alone, respectively. A black arrow indicates presence of D-Ctl

$\text{Ca}(\text{OH})_2$ is Cytotoxic for HGF-1 at High Concentration

Cytotoxicity of solutions of $\text{Ca}(\text{OH})_2$ at various concentrations (0.425 mg/mL, 0.85 mg/mL, 1.7 mg/mL) was assessed by MTT assays on HGF-1 grown for 72 h in culture. Cell viability was assessed and expressed as a percentage of control (without $\text{Ca}(\text{OH})_2$). $\text{Ca}(\text{OH})_2$ at 0.85 mg/mL and 0.425 mg/mL showed no statistically significant toxicity ($4\% \pm 5\%$), even after 3 days of incubation. Meanwhile, only $50\% (\pm 2\%)$ of the cells were alive after 72 h of incubation with a saturated solution of $\text{Ca}(\text{OH})_2$ (1.7 mg/mL) (Fig. 4). Based on these results, diluted solutions of $\text{Ca}(\text{OH})_2$ (0.425 mg/mL, 0.85 mg/mL) constituted better choices than a saturated solution for subsequent assays.

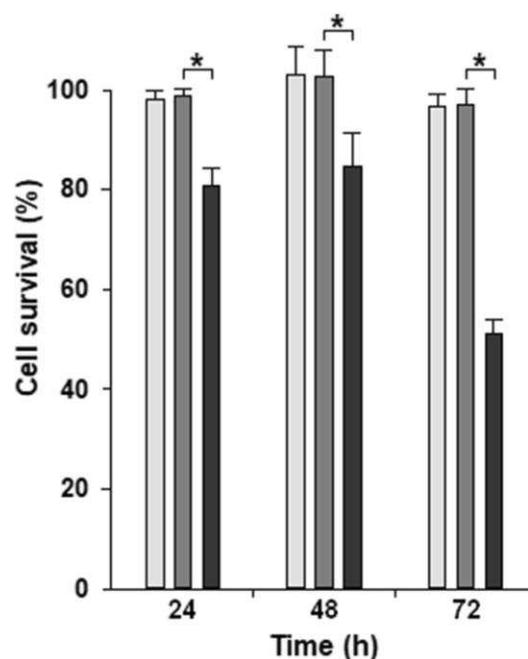


Fig. 4 Cytotoxicity of $\text{Ca}(\text{OH})_2$ towards human gingival fibroblasts ($n=5$). The bars represent cytotoxicity for a solution of $\text{Ca}(\text{OH})_2$ at 0.425 mg/mL (light grey bars), 0.85 mg/mL (dark grey bars) and 1.7 mg/mL (black bars). Statistical significance was determined by the Two-Way Analysis of Variance ($p < 0.05$ is indicated by “*”)

Combination of D-Ctl and $\text{Ca}(\text{OH})_2$ Inhibits Key Endodontic Pathogens

Since D-Ctl displayed antimicrobial activity against *E. faecalis* and was stable in $\text{Ca}(\text{OH})_2$, experiments were conducted to determine the most efficient and the least toxic combination of these antimicrobial agents to eradicate root canal pathogens.

To identify the most efficient combination of $\text{Ca}(\text{OH})_2$ and D-Ctl to inhibit the growth of *E. faecalis*, broth dilution assays were performed with different concentrations of $\text{Ca}(\text{OH})_2$ and D-Ctl. Specifically, a solution of $\text{Ca}(\text{OH})_2$ at non-toxic concentrations (0.85 mg/mL, 0.425 mg/mL) was combined with the MIC, $\frac{1}{2}$ MIC and $\frac{1}{4}$ MIC of D-Ctl (Fig. 5). As depicted, the combination using the lowest concentration of $\text{Ca}(\text{OH})_2$ and D-Ctl able to inhibit *E. faecalis* growth was a solution of $\text{Ca}(\text{OH})_2$ at 0.85 mg/mL with $\frac{1}{2}$ MIC of D-Ctl (78 $\mu\text{g}/\text{mL}$) (Fig. 5).

The stability of D-Ctl after 24 h in such a solution was confirmed by HPLC (Fig. 6a). Indeed, D-Ctl eluted at 38 min (Fig. 6a, chromatogram 1) was stable in a solution of $\text{Ca}(\text{OH})_2$ at 0.85 mg/mL (pH 9) (Fig. 6a, chromatogram 2). Shoulder on the peaks corresponds to an oxidized form of D-Ctl. The areas under the curves were calculated in three independent experiments for both conditions. The ratio of areas under the curve of chromatogram 2 to chromatogram

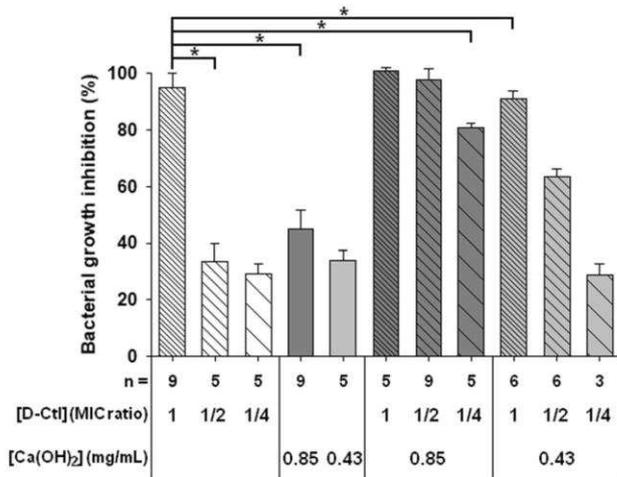


Fig. 5 Inhibition of *E. faecalis* growth by various combinations of $\text{Ca}(\text{OH})_2$ and D-Ctl. The combinations tested are indicated on the graph. The number of replicates (n) is indicated on the graph for each combination. Statistical significance was determined by the two-way analysis of variance ($p < 0.05$ is indicated by “**”))

1 was 1.075 ± 0.06 . We also assessed the cytotoxicity of this combination towards HGF-1 by MTT assays during 72 h. No statistically significant decrease in cell viability was observed (Fig. 6b).

Finally, we verified that this combination was also efficient against the most common endodontic pathogens. To this aim, in addition to *E. faecalis*, we performed broth dilution assays against *P. micra*, *P. intermedia*, *F. nucleatum* and *C. albicans* (Fig. 6c). Our results showed that $\text{Ca}(\text{OH})_2$ at 0.85 mg/mL was able to inhibit 87% ($\pm 2\%$) of *C. albicans* growth, 15% ($\pm 6\%$) of *P. micra* growth, 77% ($\pm 6\%$) of *P. intermedia* growth and 30% ($\pm 10\%$) of *F. nucleatum* growth, whereas the combination inhibited respectively 97% ($\pm 1\%$), 98% ($\pm 2\%$), 98% ($\pm 3\%$) and 97% ($\pm 5\%$) of the pathogen’s growth. Therefore, the combination of D-Ctl and $\text{Ca}(\text{OH})_2$ is efficient against other key endodontic pathogens like *C. albicans*, *P. micra*, *P. intermedia* and *F. nucleatum*.

Discussion

The use of antimicrobial agents able to eliminate resistant species from root canals and to modulate the periapical inflammatory-immune response may improve the success rate of endodontic treatments (Turner et al. 2004; Lima et al. 2015). In the field of endodontics, AMPs have been studied as irrigants, used during chemomechanical preparation and as intracanal medicament, applied between treatment sessions.

Concerning endodontic irrigants, DJK-5, a cationic peptide, was shown to be effective in improving the

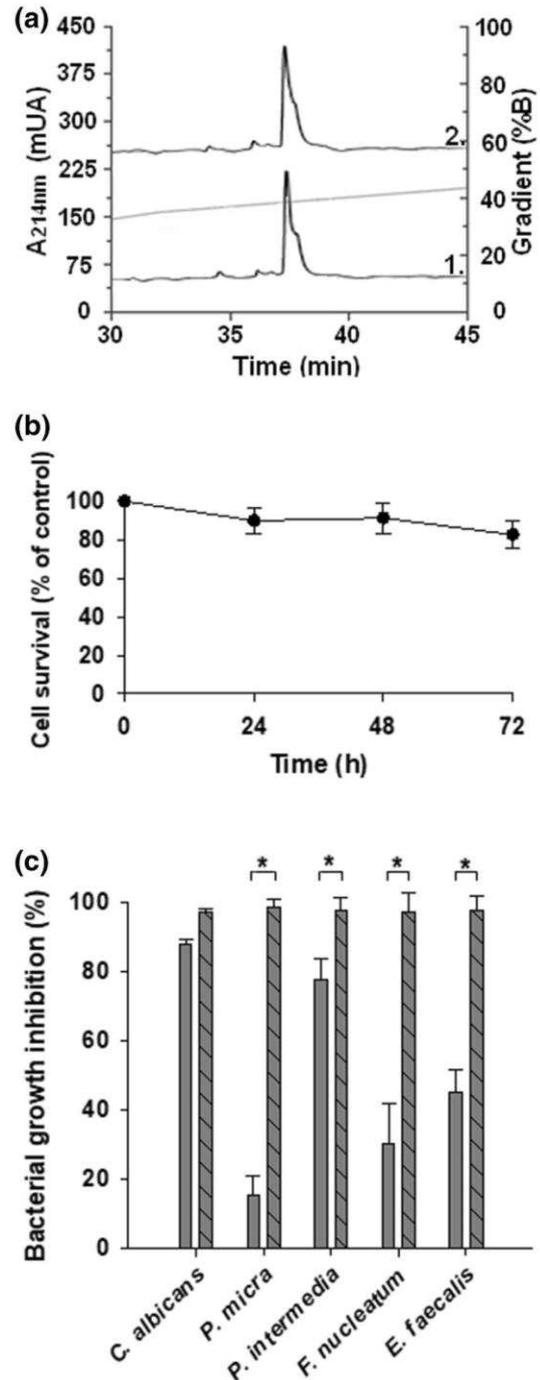


Fig. 6 Stability, cytotoxicity and antimicrobial activity of the combination between D-Ctl and $\text{Ca}(\text{OH})_2$. **a** The chromatograms 1 and 2 correspond to D-Ctl diluted in milli-Q water and the combination of $\text{Ca}(\text{OH})_2$ at 0.85 mg/mL and $\frac{1}{2}$ MIC of D-Ctl (pH 9) respectively. **b** The cytotoxicity of the combination between $\text{Ca}(\text{OH})_2$ at 0.85 mg/mL and $\frac{1}{2}$ MIC of D-Ctl on HGF-1 cells was assessed with MTT assays (n=4). The Kruskal–Wallis One-Way Analysis of Variance on Ranks showed no statistical significance ($p=0.239$). **c** The efficacy of the combination between $\text{Ca}(\text{OH})_2$ at 0.85 mg/mL and $\frac{1}{2}$ MIC of D-Ctl (striped bars) compared with $\text{Ca}(\text{OH})_2$ at 0.85 mg/mL (grey bars) was assessed on four other main endodontic pathogens (n=3). Statistical significance was determined by t-test ($p < 0.05$ is indicated by “**”))

antimicrobial efficacy of a rinse of 6% sodium hypochlorite followed by rinse with ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) (Wang et al. 2018). Furthermore, nisin, an AMP derived from *Lactococcus lactis* (Severina et al. 1998), was demonstrated to improve the antimicrobial efficacy of two conventional endodontic irrigants (Mixture of A Tetracycline Isomer, An Acid and A Detergent (MTAD) and sodium hypochlorite), against some Gram-positive bacteria associated with persistent intracanal infection, including *E. faecalis* (Tong et al. 2012, 2014; Kajwadkar et al. 2017). Therefore, nisin has potential as an alternative to conventional irrigation with sodium hypochlorite.

Another aspect of endodontic disinfection is the use of an intracanal medicament, such as $\text{Ca}(\text{OH})_2$, to prevent the multiplication of residual microorganisms in the root canal between treatment sessions. Two peptides have been studied as intracanal medicaments: Human β -defensin-3 (HBD3), an epithelial derived cationic AMP (Harder et al. 2001), widely expressed in the oral cavity and nisin. In recent studies, HBD3 demonstrated better antimicrobial activities against *E. faecalis* biofilms and multispecies biofilms than $\text{Ca}(\text{OH})_2$ and chlorhexidine (Lee et al. 2013a, b; Ahn et al. 2017). Nisin has also been shown to be effective in inhibiting *E. faecalis* with a minimum bactericidal concentration (MBC) of 70 mg/mL and *Streptococcus gordonii* with a MBC of 20 mg/mL (Turner et al. 2004). However, nisin alone may not be an appropriate intracanal medicament, because it is less effective against Gram-negative bacteria, which are also present in infected root canals (Turner et al. 2004).

Even though AMPs can seem suitable to improve the root canal distinction, one barrier to their therapeutic applications is that they are expensive to manufacture (Hancock and Sahl 2006). HBD3 for example, is a cationic peptide of 45 residues with a complex tertiary structure that makes its synthesis difficult (Dhople et al. 2006). In this perspective, D-Ctl seemed to be a good candidate for this study as it is short and linear (15 amino acids).

Besides their costs, AMPs also have the drawback to be susceptible to proteolytic degradation. *E. faecalis* can overcome the innate immune system response and trigger persistent infections. One of its mechanisms of resistance is the degradation of AMPs (Schmidtchen et al. 2002; Nešuta et al. 2017). For example, proteases secreted by *E. faecalis* can degrade LL-37 and HYL-20, two AMPs known for their antimicrobial properties (Schmidtchen et al. 2002; Nešuta et al. 2017). In order to counteract an endodontic infection, D-Ctl should not

be degraded by the proteases secreted by *E. faecalis*. Our study showed that D-Ctl maintains its integrity in presence of *E. faecalis* (Fig. 3b). Indeed, as D-Ctl strictly consists of D-amino acids, it is not sensitive to bacterial proteases (Zaet et al. 2017). Interestingly, D-Ctl is also stable in $\text{Ca}(\text{OH})_2$ and their combination ($\text{Ca}(\text{OH})_2$ (0.85 mg/mL) and D-Ctl ($1/2$ MIC)) is able to completely inhibit *E. faecalis* growth (Fig. 6). Recent studies, using *Escherichia coli* as a model, have shown that the bacteriolytic activity of D-Ctl is due to the rapid permeabilization of the bacterial cell membrane leading to bacterial death (Zaet et al. 2017). This mechanism is due to the positive charge and amphipathic structure of the AMPs, allowing them to interact with negatively charged phospholipid bilayers, causing the disruption of bacterial cell membranes (Nešuta et al. 2017).

The absence of cytotoxicity is also an important characteristic for an efficient intracanal medicament. From this point of view, $\text{Ca}(\text{OH})_2$ and chlorhexidine are the most acceptable intracanal medicaments while others, like phenol and formocresol are highly cytotoxic (Kawashima et al. 2009). In our study, $\text{Ca}(\text{OH})_2$ at high concentrations (1.7 mg/mL) was found to be toxic to HGF-1 after 72 h (Fig. 4). Therefore, our work focused on finding a combination including lower concentration of $\text{Ca}(\text{OH})_2$ (0.425 mg/mL and 0.85 mg/mL). Interestingly, $\text{Ca}(\text{OH})_2$ at 0.85 mg/mL alone or in combination with D-Ctl was not toxic to HGF-1.

Even though *E. faecalis* is strongly correlate with endodontic failure, several other pathogens are involved in endodontic infection. Here, we showed that the combination between D-Ctl and $\text{Ca}(\text{OH})_2$ is also efficient against four other endodontic pathogens: *P. micra*, *P. intermedia*, *F. nucleatum* and *C. albicans*. Interestingly, *F. nucleatum* and *P. intermedia* are Gram-negative bacteria, showing that the efficacy of D-Ctl does not only concern Gram-positive species. These encouraging results suggest that this combination therapy could eradicate endodontic biofilms.

Despite promising preliminary results about the antimicrobial efficacy of the combination of D-Ctl and $\text{Ca}(\text{OH})_2$, this drug combination was tested in vitro against planktonic bacteria and might not necessarily be effective against multi-species microbial biofilms in vivo. Therefore, further investigations are needed to test the efficiency of this combination. Interestingly, we present a comparison of sequences of Ctl with two others potent anti-biofilm AMPs (Fig. 7) (Pletzer and Hancock 2016). This comparison suggests that Ctl belongs to the same group of amphipathic peptides and could therefore be efficient against biofilms.

Peptide	Sequence	Positive charges	Hydrophobic residues
D-Ctl	<u>R</u> S M <u>R</u> L S <u>F</u> <u>R</u> A <u>R</u> G Y G <u>E</u> <u>R</u>	+5	5
IDR 1018	V <u>R</u> L T V A <u>V</u> <u>R</u> T M - - <u>R</u> <u>R</u>	+4	7
DJK 5	V Q M <u>R</u> - A <u>I</u> <u>R</u> <u>V</u> <u>R</u> V I - - <u>R</u>	+4	6
Consensus sequence	x x H B H x H B x B x H x x B	+4	4

Fig. 7 Comparison sequence of D-Ctl with other amphipatic anti-bio-film peptides. Basic residues are underlined and hydrophobic residues framed. Positive charges and the number of hydrophobic residues are

indicated for each AMP. The final line presents a consensus sequence where basic residues (B) and hydrophobic residues (H) are pointed out

Acknowledgements This work was supported by the Marie Curie Research Grants Scheme, CIG (Career Integration Grant) attributed to CM.

Compliance with Ethical Standards

Conflict of interest The authors declare that they have no conflict of interest.

References

- Ahn KB, Kim AR, Kum KY, Yun CH, Han SH (2017) The synthetic human beta-defensin-3 C15 peptide exhibits antimicrobial activity against *Streptococcus mutans*, both alone and in combination with dental disinfectants. *J Microbiol* 55:830–836. <https://doi.org/10.1007/s12275-017-7362-y>
- Aslam R, Atindehou M, Lavaux T, Haïkel Y, Schneider F, Metz-Boutigue MH (2012) Chromogranin A-derived peptides are involved in innate immunity. *Curr Med Chem* 19:4115–4123. <https://doi.org/10.2174/092986712802430063>
- Aslam R, Marban C, Corazzol C et al (2013) Cateslytin, a chromogranin a derived peptide is active against *Staphylococcus aureus* and resistant to degradation by its proteases. *PLoS ONE* 8:e68993. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0068993>
- Briolat J, Wu SD, Mahata SK et al (2005) New antimicrobial activity for the catecholamine release-inhibitory peptide from chromogranin A. *Cell Mol Life Sci* 62:377–385. <https://doi.org/10.1007/s00018-004-4461-9>
- Byström A, Sundqvist G (1981) Bacteriologic evaluation of the efficacy of mechanical root canal instrumentation in endodontic therapy. *Scand J Dent Res* 89:321–328. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0722.1981.tb01689.x>
- Caplan DJ, Chasen JB, Krall EA et al (2006) Lesions of endodontic origin and risk of coronary heart disease. *J Dent Res* 85:996–1000. <https://doi.org/10.1177/154405910608501104>
- Caplan DJ, Pankow JS, Cai J, Offenbacher S, Beck JD (2009) The relationship between self-reported history of endodontic therapy and coronary heart disease in the atherosclerosis risk in communities study. *J Am Dent Assoc* 140:1004–1012. <https://doi.org/10.14219/jada.archive.2009.0311>
- Dartevelle P, Ehlinger C, Zaet A et al (2018) D-Cateslytin: a new antifungal agent for the treatment of oral *Candida albicans* associated infections. *Sci Rep* 8:9235. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-27417-x>

- Dhople V, Krukemeyer A, Ramamoorthy A (2006) The human beta-defensin-3, an antibacterial peptide with multiple biological functions. *Biochim Biophys Acta* 1758:1499–1512. <https://doi.org/10.1016/j.bbame.2006.07.007>
- El Karim I, Kennedy J, Hussey D (2007) The antimicrobial effects of root canal irrigation and medication. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 103:560–569. <https://doi.org/10.1016/j.tripleo.2006.10.004>
- Evans M, Davies JK, Sundqvist G, Figdor D (2002) Mechanisms involved in the resistance of *Enterococcus faecalis* to calcium hydroxide. *Int Endod J* 35:221–228. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2591.2002.00504.x>
- Fava LR, Saunders WP (1999) Calcium hydroxide pastes: classification and clinical indications. *Int Endod J* 32:257–282. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2591.1999.00232.x>
- Ferreira FB, Torres SA, Rosa OP, Ferreira CM, Garcia RB, Marcucci MC, Gomes BP (2007) Antimicrobial effect of propolis and other substances against selected endodontic pathogens. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 104:709–716. <https://doi.org/10.1016/j.tripleo.2007.05.019>
- Figdor D, Davies JK, Sundqvist G (2003) Starvation survival, growth and recovery of *Enterococcus faecalis* in human serum. *Oral Microbiol Immunol* 18:234–239. <https://doi.org/10.1034/j.1399-302X.2003.00072.x>
- Gupta SP, Bhati M, Jhajharia K, Patel H, Paliwal A, Franklin S (2015) Evaluation of antimicrobial and antifungal efficacy of inter appointment intracanal medicaments against *Enterococcus* and *Candida albicans*: an in vitro study. *J Int Oral Health* 7:97–102
- Haapasalo M, Endal U, Zandi H, Coil JM (2005) Eradication of endodontic infection by instrumentation and irrigation solutions. *Endod Top* 10:77–102. <https://doi.org/10.1111/j.1601-1546.2005.00135.x>
- Hancock REW, Sahl H (2006) Antimicrobial and host-defense peptides as new anti-infective therapeutic strategies. *Nat Biotechnol* 24:1551–1557. <https://doi.org/10.1038/nbt1267>
- Harder J, Bartels J, Christophers E, Schroder JM (2001) Isolation and characterization of human beta-defensin-3, a novel human inducible peptide antibiotic. *J Biol Chem* 276:5707–5713. <https://doi.org/10.1074/jbc.M008557200>
- Joshi KJ, Pitiphat W, Hung HC, Willett WC, Colditz GA, Douglass CW (2006) Pulpal inflammation and incidence of coronary heart disease. *J Endod* 32:99–103. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2005.10.039>
- Kajwadkar R, Shin JM, Lin GH, Fenno JC, Rickard AH, Kapila YL (2017) High-purity nisin alone or in combination with sodium hypochlorite is effective against planktonic and biofilm populations of *Enterococcus faecalis*. *J Endod* 43:989–994. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2017.01.034>

- Kawashima N, Wadachi R, Suda H, Yeng T, Parashos P (2009) Root canal medicaments. *Int Dent J* 59:5–11. https://doi.org/10.1922/IDJ_2060Kawashima07
- Lambert RJ, Pearson J (2000) Susceptibility testing: accurate and reproducible minimum inhibitory concentration (MIC) and non-inhibitory concentration (NIC) values. *J Appl Microbiol* 88:784–790. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2000.01017.x>
- Law A, Messer H (2004) An evidence-based analysis of the antibacterial effectiveness of intracanal medicaments. *J Endod* 30:689–694. <https://doi.org/10.1097/01.don.0000129959.20011.ee>
- Lee JK, Chang SW, Perinpanayagam H et al (2013a) Antibacterial efficacy of a human β -defensin-3 peptide on multispecies biofilms. *J Endod* 39:1625–1629. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2013.07.035>
- Lee JK, Park YJ, Kum KY et al (2013b) Antimicrobial efficacy of a human β -defensin-3 peptide using an *Enterococcus faecalis* dentine infection model. *Int Endod J* 46:406–412. <https://doi.org/10.1111/iej.12002>
- Lima SMF, de Pádua GM, Sousa MGDC, Freire MS, Franco OL, Rezende TMB (2015) Antimicrobial peptide-based treatment for endodontic infections—biotechnological innovation in endodontics. *Biotechnol Adv* 33:203–213. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2014.10.013>
- Love RM (2001) *Enterococcus faecalis*—a mechanism for its role in endodontic failure. *Int Endod J* 34:399–405. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2591.2001.00437.x>
- Lugardon K, Chasserot-Golaz S, Kieffer AE et al (2001) Structural and biological characterization of chromofungin, the antifungal chromogranin A-(47-66)-derived peptide. *J Biol Chem* 276:35875–35882. <https://doi.org/10.1074/jbc.M104670200>
- McHugh CP, Zhang P, Michalek S, Eleazer PD (2004) pH required to kill *Enterococcus faecalis* in vitro. *J Endod* 30:218–219. <https://doi.org/10.1097/00004770-200404000-00008>
- Mohammadi Z, Dummer PM (2011) Properties and applications of calcium hydroxide in endodontics and dental traumatology. *Int Endod J* 44:697–730. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2591.2011.01886.x>
- Mohammadi Z, Shalavi S, Yazdizadeh M (2012) Antimicrobial activity of calcium hydroxide in endodontics: a review. *Chonnam Med J* 48:133–140. <https://doi.org/10.4068/cmj.2012.48.3.133>
- Nair PN (2006) On the causes of persistent apical periodontitis: a review. *Int Endod J* 39:249–281. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2591.2006.01099.x>
- Nešuta O, Budešínský M, Hadravová R, Monincová L, Humpolicková J, Cerovský V (2017) How proteases from *Enterococcus faecalis* contribute to its resistance to short α -helical antimicrobial peptides. *Pathog Dis* 75:15. <https://doi.org/10.1093/femspd/ftx091>
- Peciuliene V, Maneliene R, Balciškyte E, Drukteinis S, Rutkunas V (2008) Microorganisms in root canal infections: a review. *Stomatologija* 10:4–9
- Persoon IF, Özok AR (2017) Definitions and epidemiology of endodontic infections. *Curr Oral Health Rep* 4:278–285. <https://doi.org/10.1007/s40496-017-0161-z>
- Pletzer D, Hancock RE (2016) Antibiofilm peptides: potential as broad-spectrum agents. *J Bacteriol* 198:2572–2578. <https://doi.org/10.1128/JB.00017-16>
- Radek KA, Lopez-Garcia B, Hupe M et al (2008) The neuroendocrine peptide catestatin is a cutaneous antimicrobial and induced in the skin after injury. *J Invest Dermatol* 128:1525–1534. <https://doi.org/10.1038/sj.jid.5701225>
- Ricucci D, Siqueira JF (2010) Biofilms and apical periodontitis: study of prevalence and association with clinical and histopathologic findings. *J Endod* 36:1277–1288. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2010.04.007>
- Rocas IN, Siqueira JF, Santos KRN (2004) Association of *Enterococcus faecalis* with different forms of periradicular diseases. *J Endod* 30:315–320. <https://doi.org/10.1097/00004770-200405000-00004>
- Schmidtchen A, Frick IM, Andersson E, Tapper H, Bjorck L (2002) Proteinases of common pathogenic bacteria degrade and inactivate the antibacterial peptide LL-37. *Mol Microbiol* 46:157–168. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2002.03146.x>
- Severina E, Severin A, Tomasz A (1998) Antibacterial efficacy of nisin against multidrug-resistant gram-positive pathogens. *J Antimicrob Chemother* 41:341–347. <https://doi.org/10.1093/jac/41.3.341>
- Siqueira JF, Rocas IN (2009) Diversity of endodontic microbiota revisited. *J Dent Res* 88:969–981. <https://doi.org/10.1177/0022034509346549>
- Sjogren U, Figdor D, Persson S, Sundqvist G (1997) Influence of infection at the time of root filling on the outcome of endodontic treatment of teeth with apical periodontitis. *Int Endod J* 30:297–306. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2591.1997.00092.x>
- Stuart CH, Schwartz SA, Beeson TJ, Owatz CB (2006) *Enterococcus faecalis*: its role in root canal treatment failure and current concepts in retreatment. *J Endod* 32:93–98. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2005.10.049>
- Tong Z, Zhou L, Kuang R, Lv H, Qu T, Ni L (2012) *In vitro* evaluation of MTAD and nisin in combination against common pathogens associated with root canal infection. *J Endod* 38:490–494. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2011.11.015>
- Tong Z, Ni L, Ling J (2014) Antibacterial peptide nisin: a potential role in the inhibition of oral pathogenic bacteria. *Peptides* 60:32–40. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2014.07.020>
- Trope M, Bergenholtz G (2002) Microbiological basis for endodontic treatment: can a maximal outcome be achieved in one visit? *Endod Top* 1:40–53. <https://doi.org/10.1034/j.1601-1546.2002.10104.x>
- Turner SR, Love RM, Lyons KM (2004) An in vitro investigation of the antibacterial effect of nisin in root canals and canal wall radicular dentine. *Int Endod J* 37:664–671. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2591.2004.00846.x>
- Wang D, Shen Y, Hancock REW, Ma J, Haapasalo M (2018) Antimicrobial effect of peptide DJK-5 used alone or mixed with EDTA on mono- and multispecies biofilms in dentin canals. *J Endod* 44:1709–1713. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2018.07.018>
- Zaet A, Darteville P, Daouad F et al (2017) D-Cateslytin, a new antimicrobial peptide with therapeutic potential. *Sci Rep* 7:15199. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-15436-z>

Publisher's Note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

4.3 Résumé

Le succès des traitements endodontiques dépend de l'élimination des agents pathogènes intracanaux (El Karim *et al.* 2007). Puisque l'irrigation et l'instrumentation ne peuvent éliminer que partiellement les pathogènes présents dans l'endodonte, l'utilisation de médicaments intracanaux a été suggérée comme moyen de temporisation en endodontie.

Plusieurs thérapies combinées ont été mises au point à l'aide de médicaments intracanaux conventionnelles pour palier à l'effet antibactérien limité de l'hydroxyde de calcium. Parmi les médicaments les plus fréquemment utilisés, l'efficacité *in vivo* de la chlorhexidine n'a pas pu être démontrée dans le cadre de la temporisation endodontique (Paquette *et al.* 2007). De plus, le mélange d'hydroxyde de calcium et de chlorhexidine n'a montré aucun effet antimicrobien synergique ou additif (Saatchi *et al.* 2014). L'utilisation d'antibiotiques à usage local comme le Ledermix, qui mélange une tétracycline et un corticostéroïde, est une solution tentante pour éradiquer les bactéries du canal radiculaire. Cependant, l'usage excessif d'antibiotiques augmente le risque de résistances bactériennes ; ces résistances sont un problème de santé publique (Ventola 2012). Actuellement, les AMPs sont considérés comme une alternative de choix aux antibiotiques conventionnels dans de nombreux domaines médicaux. Ces AMPs ont également été étudiés comme une alternative aux médicaments intracanaux conventionnelles dans le domaine de l'endodontie (Lima *et al.* 2015). Néanmoins, aucun candidat idéal n'a pour l'instant été identifié.

Récemment, la D-Ctl a été décrite par notre laboratoire comme un peptide antimicrobien puissant, sûr et robuste qui ne provoque pas de résistance bactérienne (Zaet *et al.* 2017). Dans cette étude (article ci-dessus), nous avons montré que la D-Ctl est stable en présence de protéases sécrétées par *E. faecalis*, contrairement à d'autres peptides antimicrobiens. Après avoir vérifié la stabilité de la D-Ctl dans l'hydroxyde de calcium, nous avons identifié une combinaison de ces deux composés qui inhibe complètement la croissance de *E. faecalis* ainsi que de plusieurs pathogènes endodontiques comme *Parvimonas micra*, *Prevotella intermedia*, *Fusobacterium nucleatum* et *Candida albicans*. De plus, cette combinaison ne présente aucune toxicité pour les fibroblastes gingivaux humains.

Ces résultats encourageants suggèrent qu'une combinaison d'hydroxyde de calcium et de D-Ctl pourrait éradiquer les biofilms endodontiques et éviter la recontamination canalaire, notamment lors des procédures de régénération pulpaire. Malgré des résultats prometteurs, cette association

médicamenteuse a été testée *in vitro* contre des bactéries planctoniques et pourrait ne pas être efficace contre des biofilms microbiens multispèces *in vivo* qui sont plus résistants et peuvent utiliser l'effet tampon de la dentine pour se prémunir du pH basique de l'hydroxyde de calcium. Cette étude préliminaire (article ci-dessus) pourrait donc se poursuivre par une étude sur l'efficacité de la combinaison de l'hydroxyde de calcium et de D-Ctl proposée *ex vivo*. En effet, l'efficacité d'une médication intracanalairé peut être testée contre des biofilms bactériens créés artificiellement dans des racines extraites. Cette approche permet de se rapprocher des conditions *in vivo* où l'infection endodontique est provoquée par des biofilms bactériens avec une invasion des tubulis dentinaires et non par des bactéries planctoniques.

Chapitre 5 : DPSCs migration responses to microenvironment stiffness independently of YAP nucleocytoplasmic distribution

5.1	Introduction	104
5.2	Article	106
5.3	Résumé	106

5.1 Introduction

Les études cliniques sur la régénération pulpaire dentaire ont montré qu'il était possible de régénérer un tissu pulpaire fonctionnel grâce aux techniques de revascularisation et d'autotransplantation cellulaire. De nombreuses questions restent néanmoins ouvertes quant à ces techniques. L'autotransplantation et le cell homing reposent sur l'utilisation de matrices biodégradables dont les propriétés mécaniques peuvent influencer l'adhésion, la migration et la différenciation cellulaire (Engler *et al.* 2006). Dans ce contexte, il est intéressant de déterminer s'il existe une rigidité de la matrice qui permette d'éviter la différenciation des DPSCs avant leur activation par les signaux chimiques libérés lors d'une agression externe. La migration des DPSCs pourrait également être guidée par un éventuel gradient de rigidité. En effet, la plupart des cellules sont soumises au phénomène de durotaxie et migrent préférentiellement depuis les substrats mous vers les substrats rigides (Plotnikov *et al.* 2012, Vincent *et al.* 2013). Déterminer si les DPSCs sont également soumises à ce phénomène pourrait donner naissance à des stratégies visant à accélérer leur migration vers la jonction pulpo-dentinaire ou, à l'inverse, permettant de maintenir ces cellules au centre de la matrice en attendant leur activation.

Les DPSCs ayant été peu étudiées d'un point de vue fondamental, notre démarche scientifique s'appuie en grande partie sur les résultats publiés aux sujets des MSCs. Il a été montré que la migration et la distribution nucléocytoplasmique de YAP/TAZ dans les MSCs sont influencées par la rigidité de la matrice sur lesquelles elles sontensemencées (Dupont *et al.* 2011, Saxena *et al.* 2018). Migration et mécanotransduction sont deux phénomènes interconnectés, dépendant du cytosquelette d'actine. Les cellulesensemencées sur un substrat rigide créent plus de fibres de stress, augmentant la tension du cytosquelette. L'interaction dynamique entre l'actomyosine et les adhésions focales crée un équilibre spécifique entre adhésion et contraction, qui module la vitesse de migration cellulaire (Gupton et Waterman-Storer 2006). Cette tension est par ailleurs directement transmise au noyau par l'intermédiaire du complexe LINC, générant ainsi un étirement de la membrane nucléaire. Cet étirement provoque une ouverture des pores nucléaires qui facilite l'importation nucléaire de macromolécules, dont YAP/TAZ (Elosegui-Artola *et al.* 2017). L'entrée de YAP/TAZ dans le noyau active l'expression de nombreux gènes, qui dirigent la différenciation cellulaire (Elosegui-Artola *et al.* 2017). Cette augmentation du volume nucléaire et l'entrée de YAP/TAZ dans le noyau sont également corrélées à la décondensation de l'hétérochromatine, et donc à la différenciation cellulaire, par acétylation des histones (Killaars *et al.* 2018).

La description et la compréhension de cette cascade de mécanismes semblent cruciales dans le cadre de l'ingénierie tissulaire. Dans ce travail, nous avons souhaité explorer l'influence de la mécanotransduction sur la migration des DPSCs au travers des questions suivantes :

- La rigidité de la matrice influence-t-elle la vitesse moyenne de migration et la persistance des DPSCs ?
- La distribution nucléocytoplasmique de YAP/TAZ varie-t-elle en fonction de la rigidité de la matrice ?
- Les DPSCs expriment-elles les marqueurs de surface de différenciation cellulaire après une semaine de culture sur des matrices de rigidités variables ? Le phénomène observé est-il retrouvé au niveau du pourcentage de l'hétérochromatine nucléaire observée en MET ?
- L'exclusion et la rétention nucléaires de YAP/TAZ au moyen de drogues influencent-t-elles la migration des DPSCs ?
- Les DPSCs sont-elles soumises au phénomène de durotaxie classiquement décrit dans la littérature ?

La première étape de ce projet a été l'isolation et la caractérisation de DPSCs. Nous avons ensuite vérifié que les cellules isolées étaient capables de survivre et de proliférer sur des substrats de rigidités variées sans se différencier. Dans un second temps, nous avons étudié la migration des DPSCs en fonction de la rigidité de la matrice sur laquelle elles étaient ensemencées. Nos résultats ont montré que la vitesse moyenne de migration augmente à mesure que la rigidité du substrat diminue. Afin de déterminer le rôle de la dynamique du cytosquelette d'actine dans ce processus, nous avons inhibé la polymérisation des filaments d'actine par la latrunculine A, la formation de lamellipodes par CK666 et la contraction de la myosine II par de la blebbistatine ou par Y27632. Ces expériences nous ont donné une idée de l'importance de ces différents éléments pour la migration et la mécanotransduction des DPSCs en fonction de la rigidité du substrat. La dernière étape de ce travail a consisté à concevoir des matrices PDMS birigidités afin d'observer si les DPSCs sont effectivement soumises au phénomène de durotaxie classiquement décrit pour les MSCs et si la distribution nucléocytoplasmique de YAP/TAZ a une influence sur ce processus.

L'ensemble de ces résultats, présentés sous forme d'article, met en lumière l'influence de la rigidité du substrat sur les DPSCs.

5.2 Article

DPSCs migration responses to microenvironment stiffness independently of YAP nucleocytoplasmic distribution

Claire Ehlinger *et al.*

Abstract

The formation of reparative dentin in response to an external aggression depends on the activation of dental pulp stem cells (DPSCs), which are mesenchymal stem cells that are quiescent in their physiological state. If DPSCs are activated by chemical signals, they proliferate and migrate to the dentin before differentiating into odontoblastic cells. Migration of DPSCs is therefore a key process to avoid bacterial invasion of the dental pulp.

However, little is known about the influence of the stiffness of the environment crossed by the DPSCs on their migration. Indeed, DPSCs migrate from the center of the dental pulp, whose stiffness has been evaluated at 5 kPa, to the dentin, whose Young's modulus can reach 42 GPa. Here, we investigate the influence of the stiffness of polydimethylsiloxane substrates with a Young's modulus ranging from 1.5 kPa from 2.5 MPa on the migration of DPSCs and the localization of the Yes-associated protein (YAP).

Our observations show that the average speed of the DPSCs increases as substrate stiffness decreases and that YAP remains nuclear even on the softest substrates. The average speed of DPSCs increases on stiff substrates when myosin II is inhibited but remains unchanged on soft substrate. Interestingly, the migration speed of the DPSCs is independent of the intracellular localization of YAP. Furthermore, when DPSCs are seeded at the boundary between a stiff (400 kPa) and a soft (35 kPa) substrate, they are able to migrate from the soft to a stiff environment and inversely with no preferential direction.

Our results suggest that in the absence of chemotactic factors released during pulp inflammation, DPSCs may be free to migrate in any direction without any preferential direction created by the stiffness of the substrate.

1. Introduction

Apical periodontitis is an inflammatory process around the apex of a root, usually caused by bacterial invasion of the dental pulp. [1]. AP is a common pathology, affecting all populations with a varying prevalence [1]. Currently, the indicated treatment of apical periodontitis is to remove the necrotic pulp tissue and the root canal pathogens by chemomechanical preparation before sealing the root canal with an inert resin. Nevertheless, endodontic failures occur in 13 to 25% of the teeth with apical periodontitis. [2]. These failures can lead to tooth extraction [3]. In order to extend the survival of nonvital teeth, the dental community focuses its research on tissue engineering approaches to regenerate dental pulp instead of performing endodontic treatments.

Dental tissue engineering requires the combination of human dental pulp stem cells (DPSCs), a specifically designed scaffold and bioactive molecules [4]. The scaffold is a three-dimensional support mimicking the natural microenvironment of the DPSCs. Its role is to provide a mechanical support to the cells but also to regulate and promote specific cellular processes.

DPSCs are mesenchymal stem cells (MSCs) capable of differentiating into adipogenic, neurogenic, chondrogenic and osteogenic cells [5]. In their physiological state, they remain quiescent, in niches near blood vessels [6]. During external aggression, particularly dental caries, DPSCs are activated by the inflammation factors and chemotactic factors released by dentin demineralization [7]. The activation of DPSCs causes their proliferation, migration in contact with dentin and differentiation into odontoblastic cells [8, 9]. During this process, DPSCs are confronted with a wide range of stiffnesses, since they migrate from the center of the pulp, whose stiffness has been evaluated at 5 kPa [10] to dentin, whose Young's modulus can reach 42 GPa. [10]. Liu and coworkers demonstrated that seeding DPSCs on a stiff matrix causes dentin formation while a soft substrate promotes the formation of pulp-like tissue. Implanted *in vivo* in mice, these substrates generate a pulpo-dentin complex [11]. However, little is known about the influence of the stiffness of the environment crossed by the DPSCs on their migration.

The migration process depends on the protrusive and contractile forces exerted by the cell itself as well as on the physical properties of the microenvironment [12]. Specifically, the migration process is related to the actin cytoskeleton which is an engine of the cellular machinery. This machinery generates protrusion forces by polymerization of actin fibers or contractile forces by sliding actin fibers along the bipolar myosin II filaments. Interestingly, contractility of myosin II is a pathway required for translocation of YAP/TAZ (Yes-Associated Protein /Transcriptional coactivator with PDZ-binding motif), two transcriptional regulators, from the cytoplasm to the nucleus. [13, 14].

YAP and TAZ are two mechanosensitive transcriptional regulators with overlapping functions, shuttling between the cytoplasm and the nucleus, where they bind to other transcription factors, including the Transcriptional Enhanced Associate Domain (TEAD) and the RUNT-related transcription factor 2 (RUNX2) to regulate gene expression [15]. YAP and TAZ play a major role in cancer and other diseases [16-18], development [19, 20] control of organ size [21] and cell migration. Indeed, Hong and co-workers demonstrated that overexpression of TAZ in low expressing MCF10A cells leads to morphologic changes characteristic of cell transformation and promotes cell migration and invasion. Inversely, RNA interference-mediated knock-down of TAZ expression in MCF7 and Hs578T cells reduces cell migration and invasion [31]. Boerckel and co-workers demonstrated that nuclear localization of YAP/TAZ in endothelial colony-forming cells allows persistent cell motility by limiting cytoskeletal and focal adhesion maturation [32]. For DPSCs, Fan and co-worker showed that a static magnetic field recruits YAP/TAZ to the nucleus and promotes cell migration [22]. It has been shown that the localization of YAP/TAZ depends on mechanical signals, such as the stiffness of the extracellular matrix [23]. Its study is therefore particularly interesting to understand the relationship between substrate stiffness and cell migration.

The goal of the present work was to investigate the influence of substrate stiffness on the migration of DPSCs. We also examined whether correlations exist with YAP nucleocytoplasmic distribution. For this purpose, we monitored the migration of DPSCs on polydimethylsiloxane (PDMS) substrates with elastic moduli ranging from 1.5 kPa to 2.5 MPa.

We also considered whether DPSCs migration could be guided by a stiffness gradient. Indeed, most cells are subject to durotaxis and preferentially migrate from soft to stiff substrates [24]. Therefore, we created PDMS surfaces with a stiff area adjacent to a soft one to examine whether DPSCs prefer to migrate in one direction. Such a finding could have led to strategies to accelerate cell migration to the dentin-pulp junction or, conversely, to maintain the DPSCs in the center of the matrix while awaiting activation.

2. Materials and methods

2.1 Cell culture

2.1.1 DPSC isolation and culture

Human dental pulps were isolated in accordance with French legislation (informed patient consents, Institutional Review Board approval of the protocol used: C17-78). The pulps were obtained from immature third molars extracted for orthodontics reasons from healthy donors (18 and 30 years old). Cell cultures were established using the enzymatic dissociation method classically described [25]. Briefly, the freshly extracted teeth were cleaned, and the crown removed by using sterilized dental burs. The exposed pulp tissues were gently separated from the root with a dental tweezers and chopped into small fragments before being digested in a solution of 2.5 mg/ml collagenase A (Sigma-Aldrich, 10103586001) and 4 mg/ml dispase II (Sigma-Aldrich, 4942078001) for 2 h at 37°C. After neutralization with 10% fetal bovine serum (FBS) (Dutscher S1810-50), cells were centrifuged at 300xg for 10 min.

After filtration, cells were seeded in 25 cm² flasks in Minimum Essential Medium α (MEM α) (Gibco, 12561056), supplemented with 10% FBS, 100 units/ml penicillin, 100 mg/ml streptomycin (Dutscher, L0022-100), 0.25 μ g/ml Amphotericin B (Gibco, 15290026) and 1 ng/mL Recombinant Human Fibroblast Growth Factor Basic (Gibco, PHG6015). Flasks were incubated at 37 °C in 5% CO₂ and the medium changed thrice a week. Cells cultured until 90% of confluency were removed with trypsin (Dutscher, 0940-100) and either used for experimentation or subcultured with a ratio of 5x10⁴ cells per 75 cm² flask. DPSCs in passage numbers 3 to 6 were used for all the experiments with similar results.

2.1.2 NIH 3T3 cell culture

NIH 3T3 fibroblast cell line was purchased by ATCC (CRL-1658TM). Cells were cultured in Eagle's minimal essential medium (DMEM) High glucose medium (Dutscher, L0103-500) with 10% FBS, 100 units/ml penicillin, 100 mg/ml streptomycin. Subconfluent cells were detached by trypsinization and either used for experimentation or subcultured with a ratio of 5x10⁴ cells per 75 cm² flask.

2.2 Phenotypic characterization by flow cytometry

Expression of the cell surface markers CD45, CD73, CD34, CD105, CD146, CD14, CD19 and HLA-DR was analyzed using flow cytometry. DPSCs were detached by trypsinization at passage 3. For each analysis, cells were adjusted to 10^6 cells/tube and then centrifuged for 5 min at 300xg. After eliminating the supernatant, 5 μ L of each antibody was added. The tubes were agitated and incubated for 20 min at room temperature in the dark. Cells were then washed with 2 mL of Phosphate Buffered Saline (PBS) (Dutscher, L0615-500), re-centrifuged, placed in 0.2 mL of PBS and submitted to flow cytometry (Navios Flow Cytometer, Beckman Coulter). The following mouse anti-human antibodies were purchased by Beckman Coulter and used for immunostaining: FITC-conjugated CD45, PE-conjugated CD73, ECD-conjugated CD34, PC7-conjugated CD105, PC5.5-conjugated CD146, Krome Orange-conjugated CD14, Krome Orange-conjugated CD19 and Krome Orange-conjugated HLA-DR. Data were analyzed by Kaluza Analysis Software (Beckman Coulter).

2.3 In vitro multidifferentiation

Adipogenic and osteogenic differentiation: the cultures were initiated at a density of 1×10^4 cells/cm² in 24-well plates. For adipogenic and osteogenic differentiation, cells were cultured in 1 mL adipocyte differentiation medium (StemPro Adipogenesis Differentiation Kit; Invitrogen, A1007001) or osteocyte differentiation medium (StemPro Osteogenesis Differentiation Kit, Invitrogen, A1007201) respectively. Controls cells were seeded at the same density in 1 mL of complete medium. Each medium was renewed twice a week. After 3 weeks of culture at 37°C and 5% CO₂, the cells were washed with 1 mL PBS, fixed with 200 μ L of 4% paraformaldéhyde (PFA) (Merck, 4005) for 15 min at room temperature and washed twice with PBS.

Lipid vesicle formation was checked by staining the cells for 15 min at room temperature with 300 μ L Oil red O (Sigma-Aldrich, O1391-250ML) diluted at 1/3 in distilled water. For osteogenic differentiation, cells were stained with 300 μ L of alizarin red (Sigma-Aldrich, A5533-25G) at 2% (pH 4.2) for 15 min at room temperature. After staining, cells were washed thrice with distilled water and observed with a light microscope (Nikon Elipse TE200).

For chondrocyte differentiation, the pellet culture technique was used. 3×10^5 cells were seeded in 15 mL tubes (Fischer Scientific) containing 1 mL chondrocyte medium (StemPro Chondrogenesis Differentiation Kit; Invitrogen, A1007101) or 1 mL complete medium for the control. The tubes were then centrifuged for 5 min at 300xg before being incubated at 37 °C and 5% CO₂. After 1 week, each

pellet was transferred in the corresponding medium into a 24-well culture plate. The complete medium and the chondrocyte medium were renewed twice a week. After 3 weeks, proteoglycan formation in the pellets was checked. After washing the pellets with PBS, cells were fixed with 200 μ L PFA 4% for 15 min at room temperature. The pellets were then rinsed two times with distilled water, stained for 30 min at room temperature with 1% alcian blue solution (Sigma-Aldrich, B8438) prepared in 0.1 M HCL, washed three times with a bleaching solution (120 mL ethanol, 80 mL acetic acid) and observed with a light microscope (Nikon Elipse TE200).

2.4 Surface preparation

DPSCs were studied on substrates of various elasticities. Glass μ -Dishes 35mm, high (Ibidi) were used as controls (Glass-Ibidi termed E_G). These dishes were covered by PDMS sheets (Staticce, France) with a Young Modulus of 2.5 MPa to obtain a stiff PDMS surface (PDMS-Staticce termed $E_{2.5M}$). μ -Dish 35mm, high ESS with a Young Modulus of 1.5 kPa (Ibidi, 81291, PDMS-Ibidi 1.5 kPa termed $E_{1.5k}$), 15 kPa (Ibidi, 81391, PDMS-Ibidi 15 kPa termed E_{15k}), or 28 kPa (Ibidi, 81191, PDMS-Ibidi 28 kPa termed E_{28k}) were also used to mimic softer substrates.

PDMS gels with two stiffnesses (PDMS_{soft-stiff}) were obtained by combining Sylgard 184 elastomer (Dow Corning) with CY 52-276 (Dow Corning®). First, a Sylgard 184 mixture, with a weight ratio of 10:1 (base:curing agent) was degassed and poured into a 2 mm thick and 2 cm in radius teflon ring (PDMS-stiff, termed E_{stiff}), fixed itself on a teflon disc. The centre of the ring was occupied by a wooden cube of 0.8 cm in length to maintain a vacant space in the PDMS. The Sylgard 184 mixture was cured for 35 min at 125 °C. The cube was then removed, the PDMS included in the ring was carefully detached from the teflon disc and fixed on a 30 mm diameter glass coverslip. A CY 52-276 mixture with a weight ratio of 1:1 (base:curing agent) was poured in the centre of the surface and left to cure overnight at 25°C (PDMS-soft, termed E_{soft}). The resulting PDMS had a stiff peripheral area and a soft central area (PDMS with two stiffnesses, termed $E_{soft-stiff}$).

Before seeding the cells, all surfaces were plasma treated for 3 min before adding 150 μ L of a collagen (Sigma-Aldrich, 11179179001) or laminin (Sigma-Aldrich, 11243217001) or fibronectin (Sigma-Aldrich, 11051407001) solution at 40 μ g/mL onto the surface for 1 h. Cells were seeded on the treated surfaces within one hour after coating.

2.5 Rheometry (characterization of the stiffness of the central / peripheral region of the PDMS substrate)

The PDMS disks, 2 cm in diameter were punched away from the raw freshly prepared materials. The thickness of the obtained PDMS disks was measured with a precision caliper. They were characterized by means of oscillating shear rheology using a Kinexus Ultra rheometer (Malvern, Great Britain) at 25 °C. The shear strain was of 1% and the frequency was decreased from 50 to 0.01 Hz, 10 measurements being performed per decade. The distance between the two plates of the rheometer was constant in each experiment and 5% lower than the measured sample thickness, meaning that the samples were prestrained during data acquisition. The acquired storage (G') and loss moduli (G'') were plotted as a function of the frequency. The storage modulus obtained at the highest frequency was used as an approximation of the materials' shear modulus, G . From this value the Young modulus, E , was estimated using a Poisson ration equal to 0.3 according to: $G = \frac{E}{2(1+\nu)}$.

2.6 Apoptotic, necrotic, healthy cells assay

The cells were seeded for 24 h on the surfaces previously described. Cells were then stained by using an apoptotic/necrotic/healthy cells detection Kit (PromoKine; PK-CA707-30018) according to the manufacturer's instructions and observed by fluorescence microscopy. When processing data with ImageJ, the 3 channels: blue, green and red were superimposed. Quantification of positive cells in the different signals: Hoechst 33342 (blue only, healthy cells), AnnexinV-FITC (apoptotics cells) and EthD-III (necrotic cells) was done using the ImageJ plugin "Cell Counter".

2.7 Cell viability and proliferation experiments (p-nitrophenyl phosphate pNPP)

DPSCs were seeded on the E_G , $E_{2.5M}$, E_{28k} , E_{15k} and $E_{1.5k}$ substrates at a density of 5×10^4 cell/cm² and cultivated at 37 °C with 5% CO₂. After 24, 48 and 72 h of culture, unattached cells were removed by two rinses with PBS at 37°C and incubated during 3 h at 37 °C, with p-nitrophenyl phosphate (pNPP) (Sigma-Aldrich, N9389) at 1 mg/ml in 0.1 M sodium acetate (pH = 5.5) and 0.1% X-100 Triton (Sigma-Aldrich, T8787). Reaction was stopped by adding 10 µL of sodium hydroxide at 1 M in each well. After transferring 200 µL of each condition in a 96-well plate, absorbance was measured at 405 nm with a Spectrofluorometer (SAFAS Xenius XC, Safas Monaco). The results were normalized with respect to the cells on the glass.

2.8 Inhibitor treatments

For drug experiments, blebbistatin (50 μM , Sigma-Aldrich, B0560), CK666 (200 μM , Sigma-Aldrich, SML0006), latrunculin (1.2 μM , Sigma-Aldrich, L5163) or Y67632 (50 μM , Sigma-Aldrich, 688000) were added 3 h before fixation or 30 min before the beginning of the videomicroscopy experiments. When trichostatin A (TSA) was used, cells were incubated in the presence of this drug (50 nM, Sigma-Aldrich, T8552) 18 h before the fixation or launch of the videomicroscopy experiments. When Wheat Germ Agglutinin (WGA), was used, cells were incubated in the presence of this drug 18h before the fixation (25 $\mu\text{g}/\text{mL}$, L0636-5MG, Sigma-Aldrich).

2.9 Immunofluorescence microscopy

Cells were seeded at a density of 1×10^4 cells/ cm^2 on the studied substrates (E_G , $E_{2.5M}$, E_{28k} , E_{15k} and $E_{1.5k}$) and cultured for 24 h. Cells were then fixed and permeabilized for 15 min in 3.7% (w/v) PFA and 0.1% (v/v) Triton X-100 in PBS. After fixation, cells were incubated for 1 h in 10% (v/v) FBS in PBS. Actin and DNA staining were realized by incubating the cells with Alexa Fluor 568 phalloidin (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$, Invitrogen, A12380) and Hoechst 33258 (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) respectively.

During this study, the following mouse anti-human antibodies were used with a dilution of 1:100: anti-vinculin (clone hVin-1, Sigma-Aldrich, V9131), anti- RUNX2 (Abcam, ab76956), anti-integrin $\beta 1$ (Sigma-Aldrich, MAB2259Z), anti-YAP (Santa Cruz Biotechnology, sc-101199) in combination with the corresponding Alexa Fluor 488-conjugated secondary goat anti-mouse antibody (1:500; Invitrogen, A-11001). A rat antihuman integrin $\alpha 6$ (Abcam ab105669) was also used in combination with an Alexa Fluor® 488-conjugated secondary antibody (1:500; Abcam, ab150157). Samples were observed in PBS. Fluorescence images were captured using a Nikon Elipse TE200 with 63x PL APO (1.4 NA) objective equipped with Nikon Digital Camera (DS-Q11MC with NIS-Elements Br software) and processed with ImageJ. The cross-sectional area of the nucleus was measured in the median focus plane of the nuclei. Simultaneously, the fluorescence intensity in this plane, corresponding to the protein analysed, was recorded. This measurement provides fluorescence intensity per unit area of the nucleus and the cytoplasm and represents a qualitative indication of the nucleocytoplasmic distribution of the protein. Quantification of vinculin spots (in μm) was performed by measuring 20 contacts per cells in 20 cells for each condition.

2.10 Electron microscopy

DPSCs were seeded on the studied matrix (E_G , $E_{2.5M}$, E_{28k} , E_{15k} and $E_{1.5k}$) at a density of 1×10^5 cells/cm² and cultivated at 37 °C with 5% CO₂. After 1 week of culture, cells were fixed in 2% PFA-2% glutaraldehyde in 50 mM cacodylate buffer (pH = 7.4) for 2 h and then fixed in 1% osmium tetroxide in 125 mM cacodylate for 30 min. All samples were dehydrated by immersing them in solutions with gradually increasing ethanol concentration (50, 70, 95, and 100% three times) for 15 min each. DPSCs on PDMS gels were included in epoxy resin (48.2% epon 812, 34% anhydride nadic methyl, 16.4% anhydride [2-dodecenyl] succinic, and 1.5% 2,4,6-tris dimethylaminoethyl] phenol) for 48 h at 60°C. After resin polymerization a heat shock was performed to remove glass coverslips and allow the samples to be cut. Transversal sections of cells were obtained by performing ultra-thin cross sections (100 nm) using an automatic ultramicrotome (Ultracut-E Ultramicrotome, Reichert Jung, USA). Sections containing the median plane of the nucleus with the nucleolus were selected for observations. Sections were stained by 5% uranyl acetate for 20 min and by 4% lead citrate. The specimens were observed with a transmission electron microscope EM208 (FEI Compagny) operating with an accelerating voltage of 70 kV. Images were captured on argentic SO163 Kodak films.

2.11 Morphological analysis

ImageJ was used to analyze the nuclear areas in fluorescent microscopy images and the proportion of heterochromatin in electron microscopy images. Approximately 20 cell nuclei were analyzed for each data set. To determine the proportion of heterochromatin in the nuclei, the stereological method was used [27].

2.12 Time-lapse video microscopy

DPSCs or NIH 3T3 were seeded on the following substrates: E_G , $E_{2.5M}$, E_{28k} , E_{15k} and $E_{1.5k}$ at a density of 3×10^4 cells/condition and cultivated for 24 h at 37 °C with 5% CO₂. Nuclei were stained with Hoechst 33342 (5 µg/mL) for 20 min and cells pretreated with CK666, blebbistatine, Y27632 or latrunculin when necessary. 30 min after adding the drugs, cells were transferred to the microscope and the time-lapse sequence was started on a Nikon Ti-E microscope equipped with a 10X Objectif (Nikon CFI Plan Fluor) and an Andor Zyla sCMOS camera and driven by the Nikon NIS-Elements Ar software. Images were acquired every 10 min for 24 h simultaneously by phase contrast and by fluorescence microscopy. Cell tracking over the 24 h was carried out by the software “NIS-Elements Ar 3D tracking” (Nikon) for at least 100 cells per experiments.

2.13 Statistical analysis

Each assay was done at least in triplicate. Data are presented on the graphs are expressed as mean \pm standard deviation. Statistical analysis and artworks were performed using SigmaPlot (release 12.5, Systat Software, Inc). Statistical significance between two groups was determined using the t-test or the Mann-Whitney Rank Sum Test. The One-Way Analysis of Variance was used to determine statistical significance between three or more groups. For each experiment, the statistical test used is indicated in the figure legend. *p*-values < 0.05 were considered statistically significant and noted by * on the graphs.

3. Results and discussion

3.1 Cells isolated from the pulp of the teeth are DPSCs

After culture, cells isolated from wisdom teeth were characterized phenotypically by flow cytometry. The isolated cells were positive for CD73, CD105 and CD146 surface markers, conventionally described for DPSCs (SI Fig. 1A). The isolated cells were also negative for CD45, CD34, CD14, CD19 and HLA-DR surface markers that are characteristic of other cell lines. In addition, the isolated cells were able to differentiate into adipogenic, osteogenic and chondrogenic cells, thus confirming that these cells were indeed DPSCs (SI Fig. 1B).

3.2 Selection of the laminin as PDMS substrate coating

PDMS, an inert material for cell adhesion, requires prior treatment with a macromolecule of the extracellular matrix to allow adhesion and migration of DPSCs. We therefore tested the most common extracellular matrix proteins to determine which one maximally improved cell migration. DPSCs cultured 24 h on glass surfaces treated either with fibronectin, laminin or collagen all displayed vinculin sites localized at the tip of actin microfilaments (Fig. 1A). Fibronectin, laminin and collagen were then tested by 24 h videomicroscopy experiments. Laminin was chosen as the coating for the rest of this study because the DPSCs had a higher average speed and persistence when they were seeded on this protein (Fig. 1B, C) DPSCs seeded on laminin displayed the $\alpha 6$ and $\beta 1$ laminins (SI Fig. 2).

3.3 Viability, proliferation and differentiation of DPSCs as a function of substrate stiffness

We next examined the viability of DPSCs on the following substrates: E_G , $E_{2.5M}$, E_{28k} , E_{15k} and $E_{1.5k}$. In control experiments, fluorescent apoptotic-necrotic-healthy assays showed that 93% of the DPSCs were alive on the glass rigid surface E_G (Fig. 2A). The results of this test show high cell survival, even on substrates with lower stiffness (91, 86, 77 and 72% cell survival on $E_{2.5M}$, E_{28k} , E_{15k} and $E_{1.5k}$ respectively) (Fig. 2A). We then studied the proliferation of DPSCs for 24, 48 and 72 h through *p*NPP assays. We observed a proliferation of DPSCs similar at all times and evaluated conditions (Fig. 2B). Finally, after a week of culture on PDMS of various stiffnesses, DPSCs showed no difference in the expression of their surface markers (Fig. 2C).

The open, active euchromatin, which is efficient for gene activation, fills practically the nucleus whereas the condensed, inactive heterochromatin is restricted to an irregular ring situated at the nuclear periphery.

Figure 1

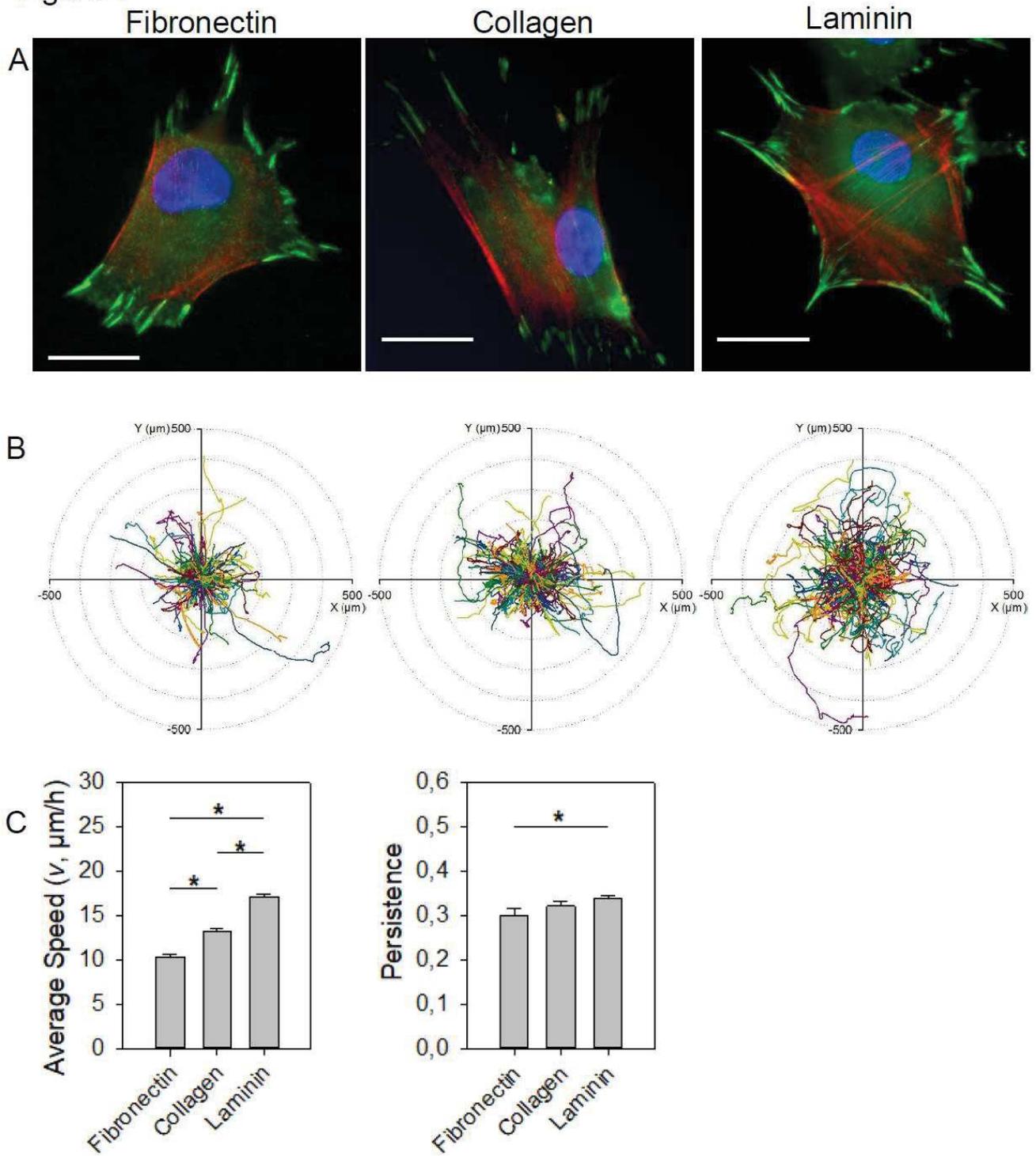


Figure 1. Average speed of the DPSCs with respect to glass substrate coating. A) Representatives images of DPSCs seeded on glass surfaces treated either with fibronectin, collagen or laminin. Images are superimposed with anti-vinculin (green), phalloidin (red) and Hoechst 33258 (blue) staining. Scale bars: 10 μm . B) DPSCs trajectories on glass surfaces treated either with fibronectin, collagen or laminin. C) Average speed (in $\mu\text{m}/\text{h}$) and persistence (no unit).

Figure 2

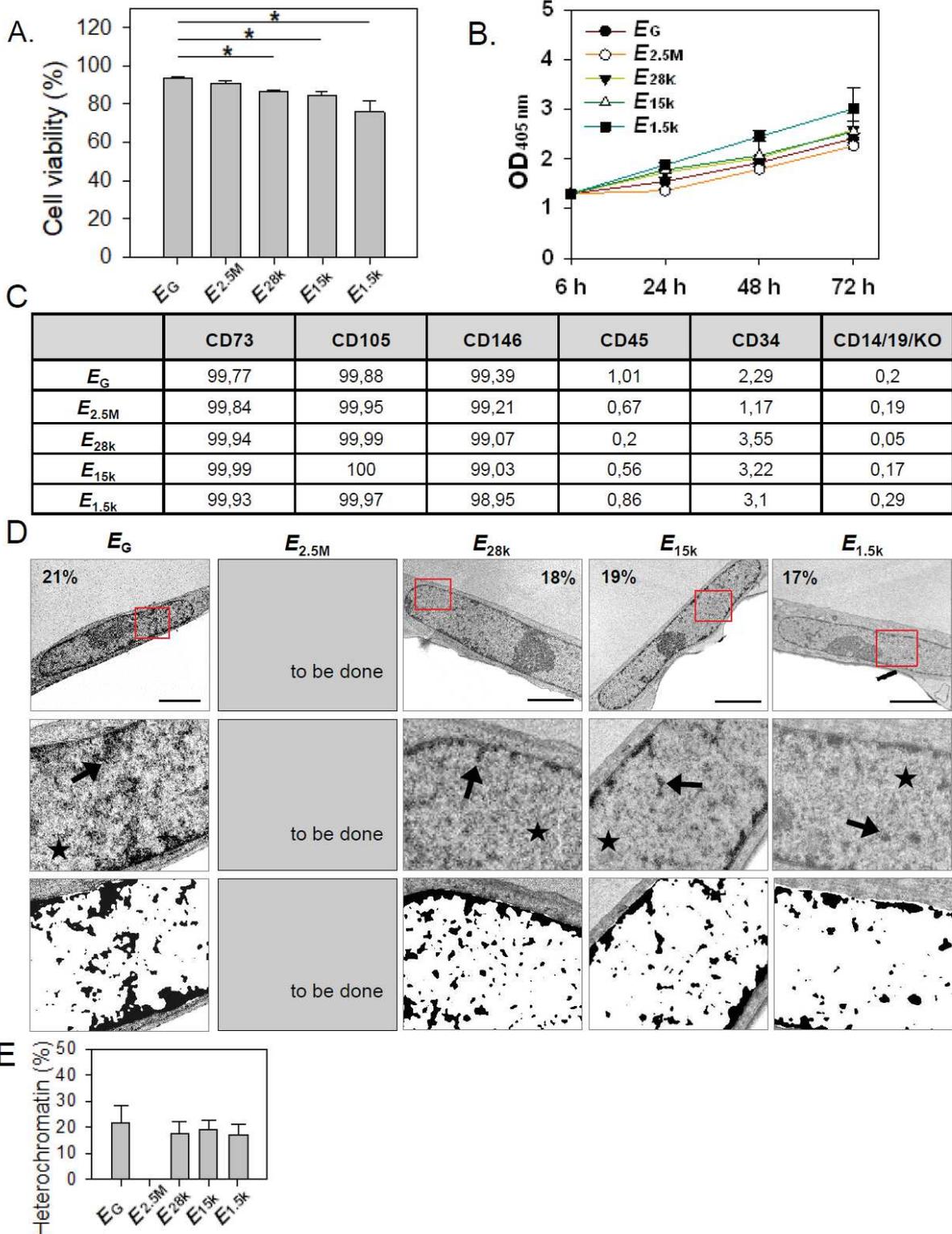


Figure 2. Viability, proliferation and differentiation of DPSCs with respect to substrate stiffness. A) Percentage of cell survival. B) Cell proliferation after 24, 48 and 72 h. C) Expression of surface markers by flow cytometry after one week of culture. D) Representative ultrastructural images of DPSCs after 7 days of culture. Scale bars: 5 μ m, arrow: heterochromatin, star: euchromatin. Indicated on the image, percentage of heterochromatin in the nucleus of approximately 20 cells for each condition. E) Percentage of heterochromatin for each condition.

The heterochromatin surrounds also the nucleolus and disseminates as aggregates in the nucleoplasm (28). Epigenetic reprogramming operates exclusively in a single direction from pluripotency to differentiation (29). Chromatin of pluripotent cells exhibits a typical open chromatin structuration, while differentiation results into significant remodeling and emergence of large dense chromatin areas. We thus explored whether DPSCs cultured for one week on the following PDMS substrates: E_G , $E_{2.5M}$, E_{28k} , E_{15k} and $E_{1.5k}$, adopted a specific chromatin conformation. To address this question, the nuclei of DPSCs were observed by transmission electron microscopy (TEM) (Fig. 2D). On E_G , DPSCs displayed euchromatin uniformly distributed within the nucleus, with a thin layer of heterochromatin at the nuclear periphery. Quantification showed that heterochromatin accounted for 21% of the nuclear chromatin. A similar chromatin pattern was displayed by DPSCs on E_{28k} , E_{15k} and $E_{1.5k}$ with heterochromatin at the nuclear periphery and no statistical difference in the percentage of heterochromatin between the samples (Fig. 2D, E). We concluded that the chromatin organization of the DPSCs was unchanged on the different stiffnesses, indicating that the mechanical properties of the environment did not cause modification of chromatin conformation (Fig. 2D and 2E).

3.4 Migration speed of the DPSCs sensibly increases when substrate stiffness decreases

To address whether substrate elasticity influences migration of DPSCs, the motility of these cells was analyzed by live imaging over a period of 24 h on the following substrates: E_G , $E_{2.5M}$, E_{28k} , E_{15k} and $E_{1.5k}$. The results are illustrated in Fig. 3A. On the tested stiffnesses, cells adopted spreading morphologies. However, on E_{28k} , E_{15k} and $E_{1.5k}$, they migrate by generating wrinkles that deform the surface of the substrate. These results suggested that DPSCs produced enough forces to deform the surface of the soft substrates. From a quantitative point of view, DPSCs have a mean speed of 17, 19, 19.7, 21.3 and 22.6 $\mu\text{m}/\text{h}$ and a persistence of 0.34, 0.39, .035, 0.37 and 0.33 (no unit) on E_G , $E_{2.5M}$, E_{28k} , E_{15k} and $E_{1.5k}$ respectively (Fig. 3D and SI Fig 3). These results indicate that cell speeds sensibly increased when substrate stiffness decreased. Conversely, mature NIH3T3 speeds decreased with the substrate stiffness (12.37, 11.1, 10.7, 9.7 and 10 $\mu\text{m}/\text{h}$ on E_G , $E_{2.5M}$, E_{28k} , E_{15k} and $E_{1.5k}$ respectively) (Fig. 3C, 3E and SI Fig. 3). DPSCs exhibited vinculin spots of 5.9, 4.3, 4.1, 3.7 and 2.6 μm on E_G , $E_{2.5M}$, E_{28k} , E_{15k} and $E_{1.5k}$ respectively (Fig. 3B and 3D). These results showed that vinculin spot lengths of DPSCs decreased when substrate stiffness decreased. These results suggested that enlarged adhesions on stiff substrates (E_G and $E_{2.5M}$) are related to reduced DPSCs speed migration. On the other hand, on soft substrates (E_{28k} , E_{15k} and $E_{1.5k}$), DPSCs had an increased average speed and smaller vinculin spots. These data are consistent with studies showing that enlarged adhesions are correlated with reduced cell migration.

Figure 3

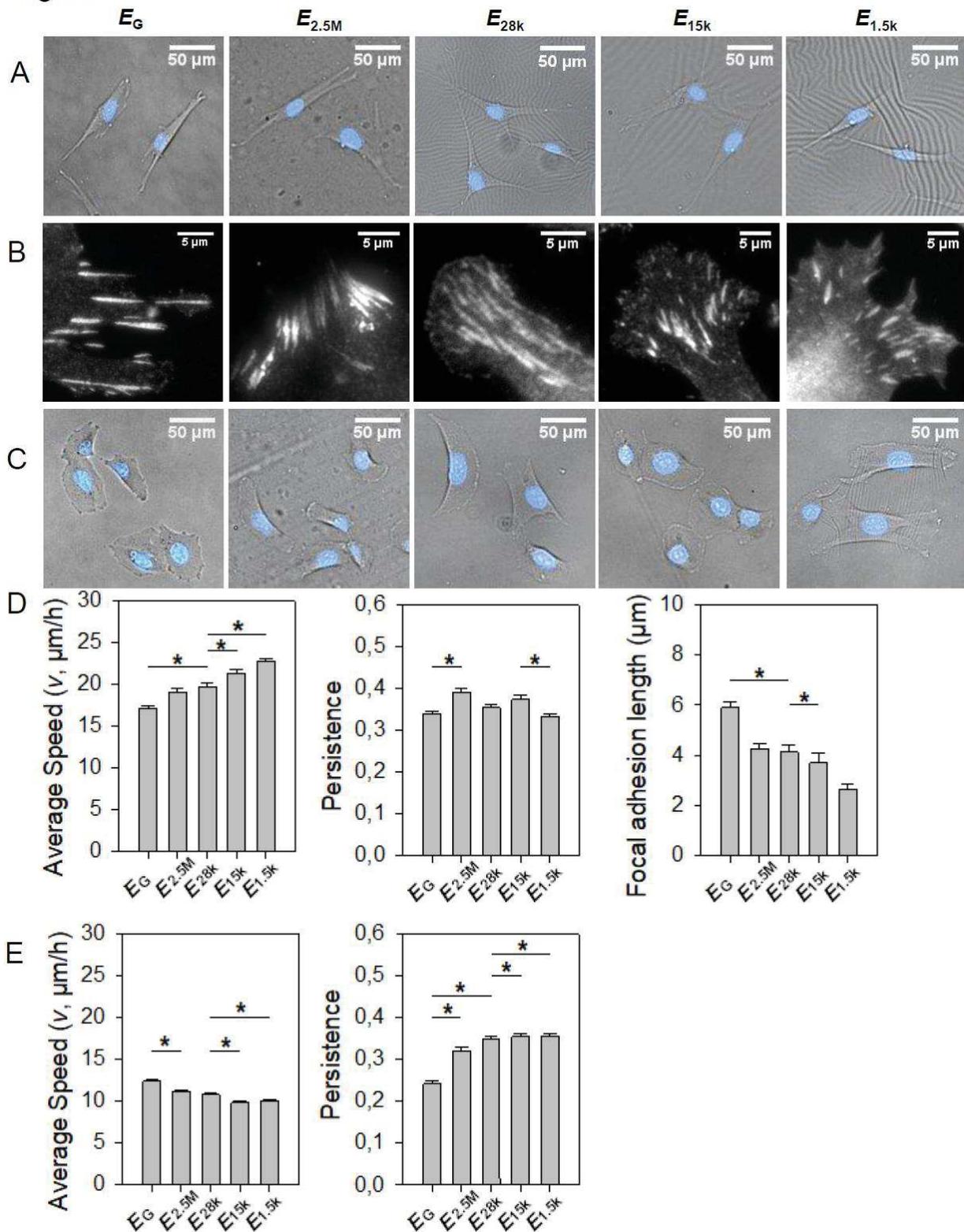


Figure 3. DPSCs and NIH 3T3 cell migration with respect to substrate stiffness. A) and C) Time-lapse images of representative cell morphology in phase contrast of DPSCs (A) and NIH 3T3 cells (C). B) Vinculin spots of DPSCs. D) Average speed (in $\mu\text{m}/\text{h}$), persistence (no unit) of DPSCs and quantification of vinculin spots (in μm). E) Average speed (in $\mu\text{m}/\text{h}$) and persistence (no unit) of NIH 3T3 cells.

3.5 DPSCs showed increased migration speed on stiff substrates and no variation on soft substrate after myosin II inhibition by blebbistatin

Actin cytoskeleton is the machinery responsible for cell migration [12]. To understand more precisely the role of actin filaments and some of their regulatory proteins in DPSCs migration on substrates of various stiffnesses, proteins involved in the actin dynamic were inhibited. For this purpose, DPSCs were either treated with blebbistatin, CK666, or latrunculin A, drugs that inhibit either the myosin II, the Arp 2/3 complex that nucleates branched actin filaments or the actin polymerization respectively. To explore the role of myosin II in the migration of DPSCs, we performed time-lapse experiments by incubating the cells with 50 μM of blebbistatin for 24 h. For all the substrate stiffnesses, DPSCs migrated in all directions, showing large filopodial extensions and retracting protrusions (Fig. 4A). Furthermore, the wrinkles were still visible on E_{28k} , E_{15k} and $E_{1.5k}$ but no longer deformed by the moving DPSCs treated with blebbistatin compared to those on these substrates without drug. For all the substrate stiffnesses, DPSCs treated with blebbistatin exhibited small vinculin spots (Fig. 4B and 4C). These results suggest that myosin II inhibition by blebbistatin reduces actomyosin contraction and therefore prevents DPSCs from exerting enough force to deform the wrinkles they had generated before treatment. Average speeds of the DPSCs on E_G , $E_{2.5M}$, and E_{28k} increased significantly in presence of blebbistatin compared to those on the same substrates without drug (24.2, 21.2, and 23.6 vs 17, 19 and 20 $\mu\text{m}/\text{h}$, respectively, Fig. 4C and SI Fig 3). Average speeds of the DPSCs on E_{15k} and $E_{1.5k}$ remained unchanged in presence of blebbistatin (21.3 and 22.6 vs 22.7 and 21.9 $\mu\text{m}/\text{h}$, respectively, Fig. 4C). The straightness of the DPSCs on E_G and $E_{2.5M}$, increased significantly in presence of blebbistatin compared to those on the same substrates without drug (0.34 and 0.39 $\mu\text{m}/\text{h}$ vs 0.44 and 0.48 $\mu\text{m}/\text{h}$ respectively, Fig. 4C). The straightness of the DPSCs on $E_{1.5k}$, E_{15k} and E_{28k} in presence of blebbistatin was similar to those on these substrates without drug (0,35, 0,37 and 0,33 vs, 0,38, 0,37 and 0,35 respectively, Fig. 4C and SI Fig. 3). Therefore, the decrease in focal contact size and cell contraction, evidenced by the absence of wrinkles in the presence of blebbistatin, seem to have less influence on the migration of DPSCs on soft substrates, to which they adhere less than on stiff substrates, on which they show larger adhesion. In summary, after myosin II inhibition by blebbistatin, we observed no decrease in DPSCs migration speed with respect to elastic modulus. For mature cells, the literature describes a drastic decrease in migration rates when myosin II is inhibited [28].

Figure 4

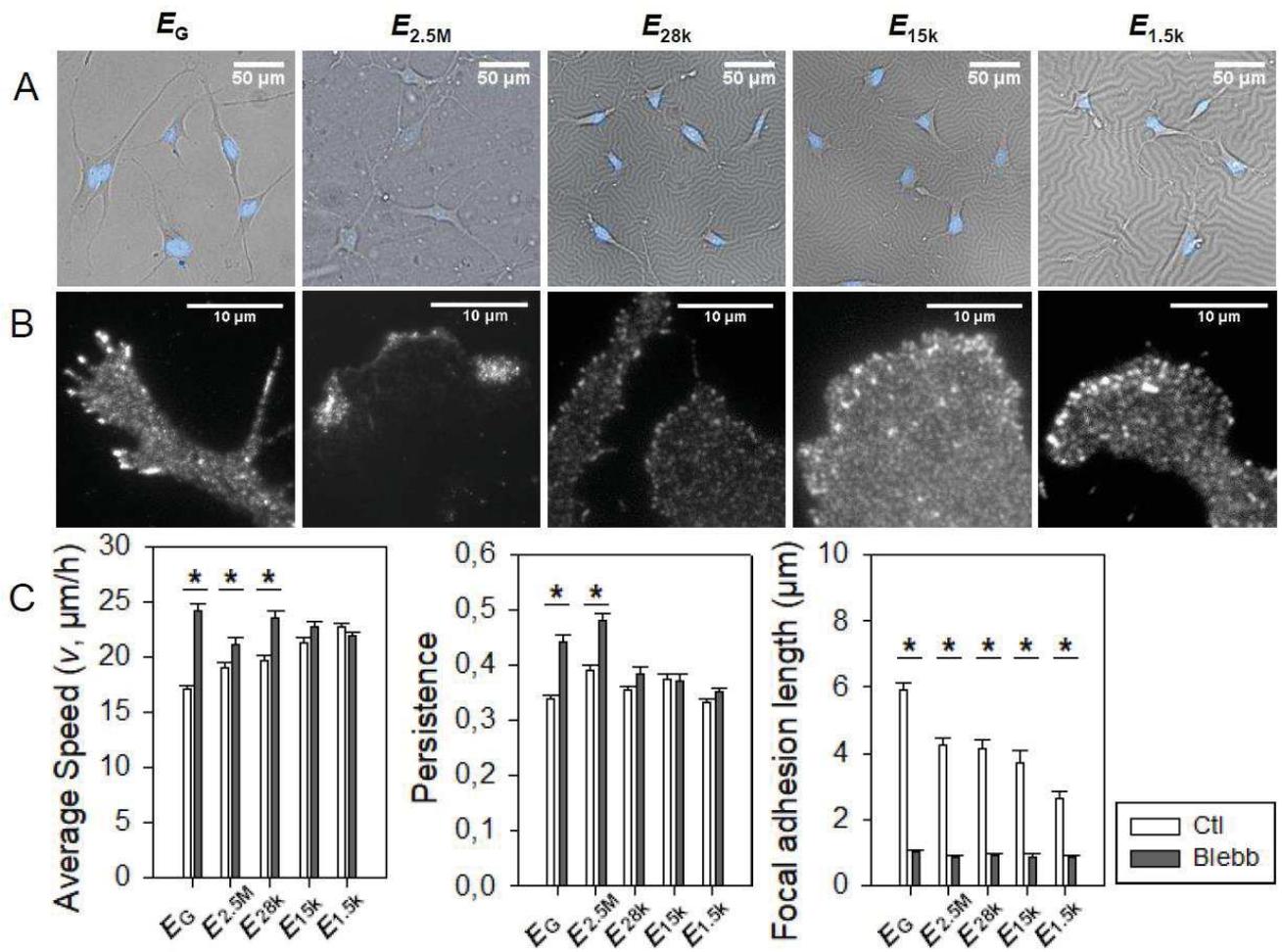


Figure 4. DPSCs migration after myosin II inhibition with respect to substrate stiffness. A) Time-lapse images of representative cell morphology in phase contrast. B) Representative images of the vinculin spots. C) Average speed (in $\mu\text{m/h}$), persistence (no unit) of DPSCs and quantification of vinculin spots (in μm).

Figure 5

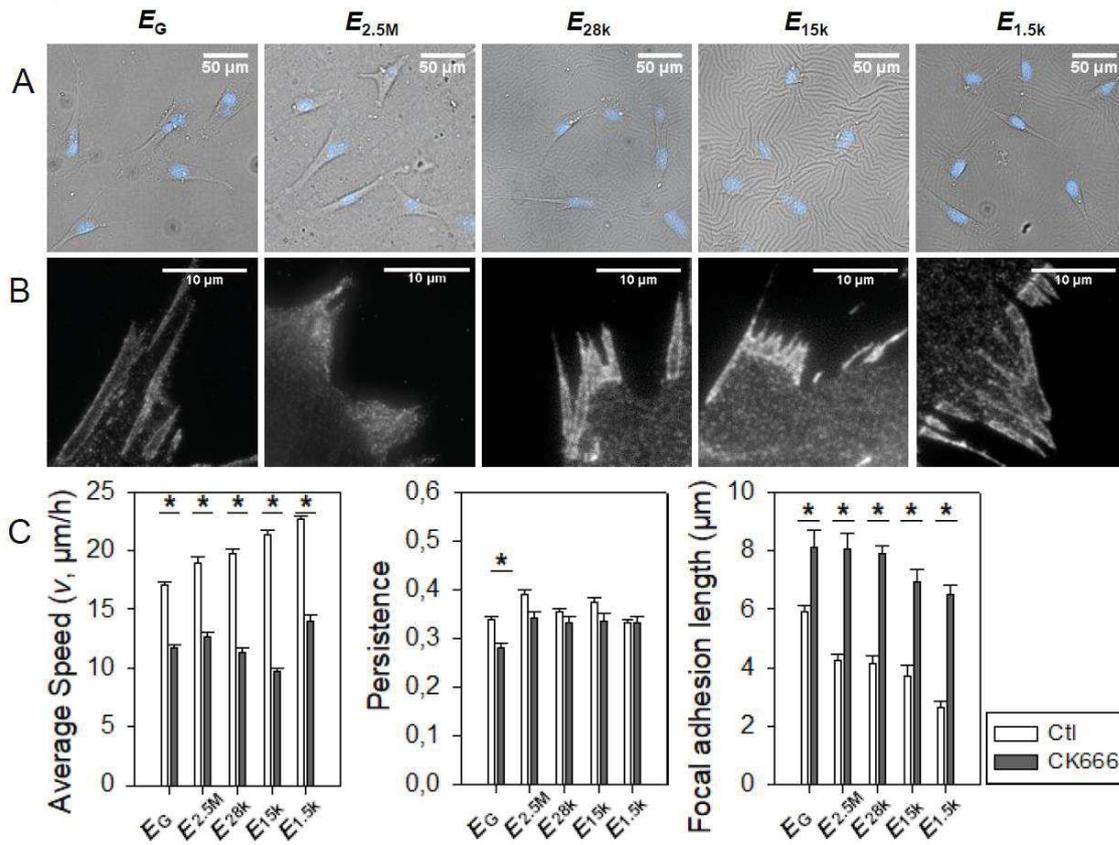


Figure 5. DPSCs migration after Arp 2/3 complex inhibition with respect to substrate stiffness. A) Time-lapse images of representative cell morphology in phase contrast. B) Vinculin spots. C) Average speed ($\mu\text{m/h}$), persistence (no unit) of DPSCs and quantification of vinculin spots (μm).

Figure 6

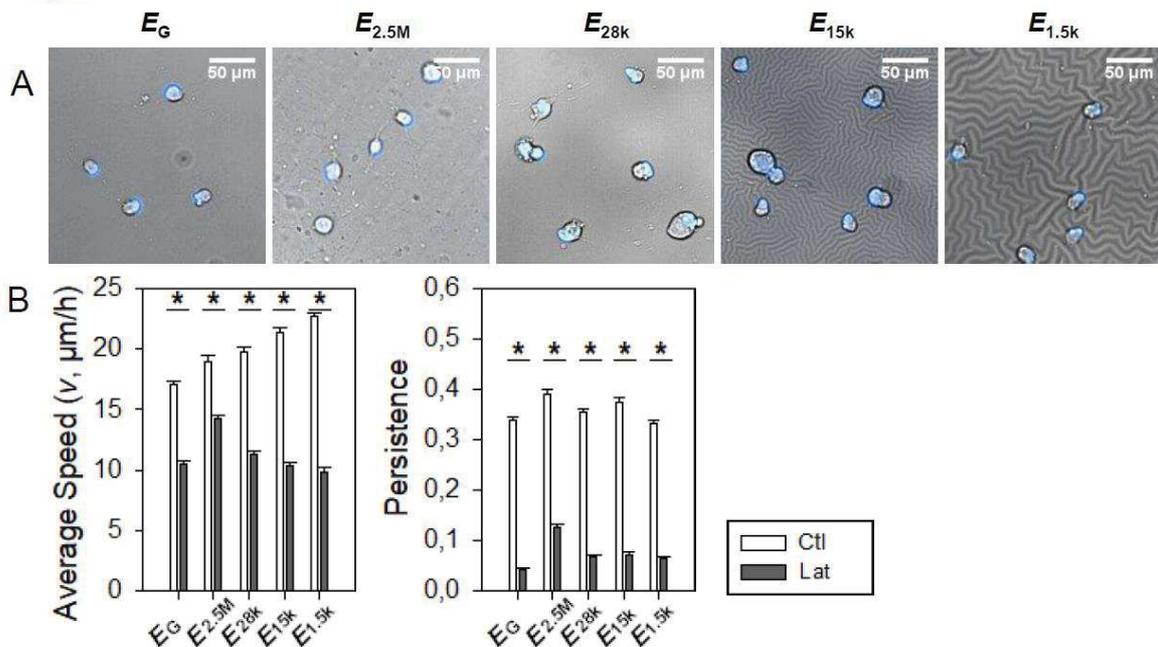


Figure 6. DPSCs migration after actin polymerization inhibition with respect to substrate stiffness. A) Time-lapse images of representative cell morphology in phase contrast. B) Average speed ($\mu\text{m/h}$), persistence (no unit) of the DPSCs.

We then tested the role of the Arp2/3 protein by inhibiting it with CK666. In this experiment, the DPSCs were incubated with 200 μ M CK666 for 30 min before the start of the videomicroscopy sequence. Under these conditions, the DPSCs lose their adhesion and adopt rounded shape morphology for few minutes before re-spreading and start their migration. This phenomenon could be observed on all stiffnesses (Fig. 5A). DPSCs treated with CK666 displayed, for all the conditions, large vinculin spots (Fig. 5B and 5C). Increase of vinculin dots length is associated with a decreased in migration speed without modification of the straightness (Fig. 5A and SI Fig. 3). DPSCs spread exhibiting filopodial extensions and retracting protrusions (Fig. 5A). These observations are consistent with those of Dang *et al* 2013 that observed that inhibition of the Arp2/3 complex by Arpin does not prevent the formation of lamellipodia but removes the existing lamellipodia that are replaced by new ectopic ones. The wrinkles detected on E_{28k} , E_{15k} and $E_{1.5k}$ were deformed by the moving DPSCs. In accordance, it has been previously reported that inhibition of the Arp2/3 complex using CK666 significantly affected the ability of glioma cells to migrate [29]. Although the effect of the inhibition of the Arp2/3 complex by CK666 on the organization of vinculin has not been characterized, it has been shown that Arp2/3 complex transiently bind to vinculin coupling membrane protrusion to matrix adhesion [30]. In the presence of latrunculin A, the DPSCs lost their adhesion, adopted a rounded morphology (consequently, actin cytoskeleton and vinculin organizations were not analyzed in these conditions) and did not migrate, whatever the rigidity of the substrate (Fig. 6A). These observations are confirmed by the average speed and persistence that decrease drastically compared to drug-free DPSCs (10.4, 14.2, 11.3, 10.3 and 9.8 vs 17, 19, 19.7, 21.3 and 22.6 μ m/h and 0.34, 0.39, 0.35, 0.37 and 0.33 vs 0.04, 0.12, 0.06, 0.07 and 0.06 for E_G , $E_{2.5M}$, E_{28k} , E_{15k} and $E_{1.5k}$ respectively, Fig. 6B and SI Fig. 3). We concluded that the migration speed of the DPSCs do not decreased despite myosin II inhibition, unlike the inhibition of Arp2/3 complex and the polymerization of actin.

3.6 Inhibition of the myosin II by blebbistatin prevented YAP nuclear accumulation with respect to elastic modulus

Chan and co-workers demonstrated that YAP/TAZ was implicated in cell migration [31]. Recently, Boerckel and co-workers demonstrated that transcription caused by YAP nuclear translation is needed for cell migration [32]. In their hands, migration ceases after 2 h of inhibition of these two activities, along with an increase in cytoskeletal tension, associated with prominent stress fibers and larger focal adhesions. Force generated by myosin II is essential for cell migration which activation and phosphorylation are regulated by Rho-associated protein kinase and myosin light chain

phosphatase. YAP/TAZ depletion was found to increase myosin II phosphorylation. They suggested a role for YAP/TAZ in negatively regulating the phosphorylation of myosin, which enabled persistent motility [32]. Therefore, we investigated YAP intracellular localization in presence of blebbistatine at cellular level. To answer this question, we first investigate the localization of YAP in DPSCs on substrates of different stiffnesses. DPSCs cultured on E_G , $E_{2.5M}$, E_{28k} , E_{15k} and $E_{1.5k}$ showed a nuclear localization of YAP (Fig. 7A and 7B). In control experiments, we studied YAP intracellular localization in NIH 3T3 cells. For NIH 3T3 cells cultured on E_G and $E_{2.5M}$, YAP was concentrated in the nuclei (Fig. 7A and 7B). On the other hand, NIH 3T3 cells cultured on E_{28k} , E_{15k} and $E_{1.5k}$ showed a cytoplasmic localization of YAP (Fig. 7A and 7B). These results suggest that for DPSCs, myosin contractility inducing nuclear accumulation of YAP, could be efficient on stiff substrates (E_G and $E_{2.5M}$) as well as on soft substrates (E_{28k} , E_{15k} and $E_{1.5k}$). To verify this hypothesis, we investigated YAP intracellular localization in presence of blebbistatin. In blebbistatin-treated DPSCs cultured on E_G and $E_{1.5k}$, YAP protein accumulated in cytoplasm (Fig. 7A and 7B). On $E_{2.5M}$, E_{28k} and E_{15k} YAP was uniformly distributed in the cytoplasm and in the nucleoplasm (Fig. 7A and 7B). These results are consistent with the literature which shows that the tension of the actin cytoskeleton is essential for the nuclear localization of YAP [13]. Thus, YAP seems to be a relay of the mechanical signals integrated by the DPSCs even on the soft PDMS substrates, as YAP is nucleoplasmic on all the studies stiffnesses. These results seem consistent with the migration speed of DPSCs which remains almost unchanged on soft substrates. This phenomenon seems characteristic of the DPSCs since the somatic cells NIH 3T3, YAP is nuclear only for cells seeded on stiff substrates. Of note, Y27632, inhibitor of Rho-associated kinase (ROCK) increased speed migration of DPSCs E_G and $E_{1.5k}$ (SI Fig. 4A). Similarly to blebbistatin, this inhibitor did not decrease the migration speed of the DPSCs and inhibited nuclear accumulation of YAP (SI Fig. 4B and 4C). As complementary control experiment, we studied YAP localization in the presence of CK666 and latrunculin A. In CK666-treated DPSCs cultured on E_G , $E_{2.5M}$, E_{28k} , E_{15k} and $E_{1.5k}$, YAP accumulated in the nucleoplasm (Fig. 7A and 7B). This result is consistent since CK666 is an actin branched inhibitor which does not influence myosin II contractility. Furthermore; the literature has not described any link between lamellipodium formation and YAP activation.

In latrunculin A-treated DPSCs cultured on E_G , YAP accumulated in the cytoplasm (Fig. 7A). This result was expected, since the integrity of the actin cytoskeleton is essential for the nuclear localization of YAP. Since we observe a total inhibition of actin polymerization on all the substrate stiffnesses, we did not repeat this experiment on the other substrates in the presence of latrunculin.

Figure 7

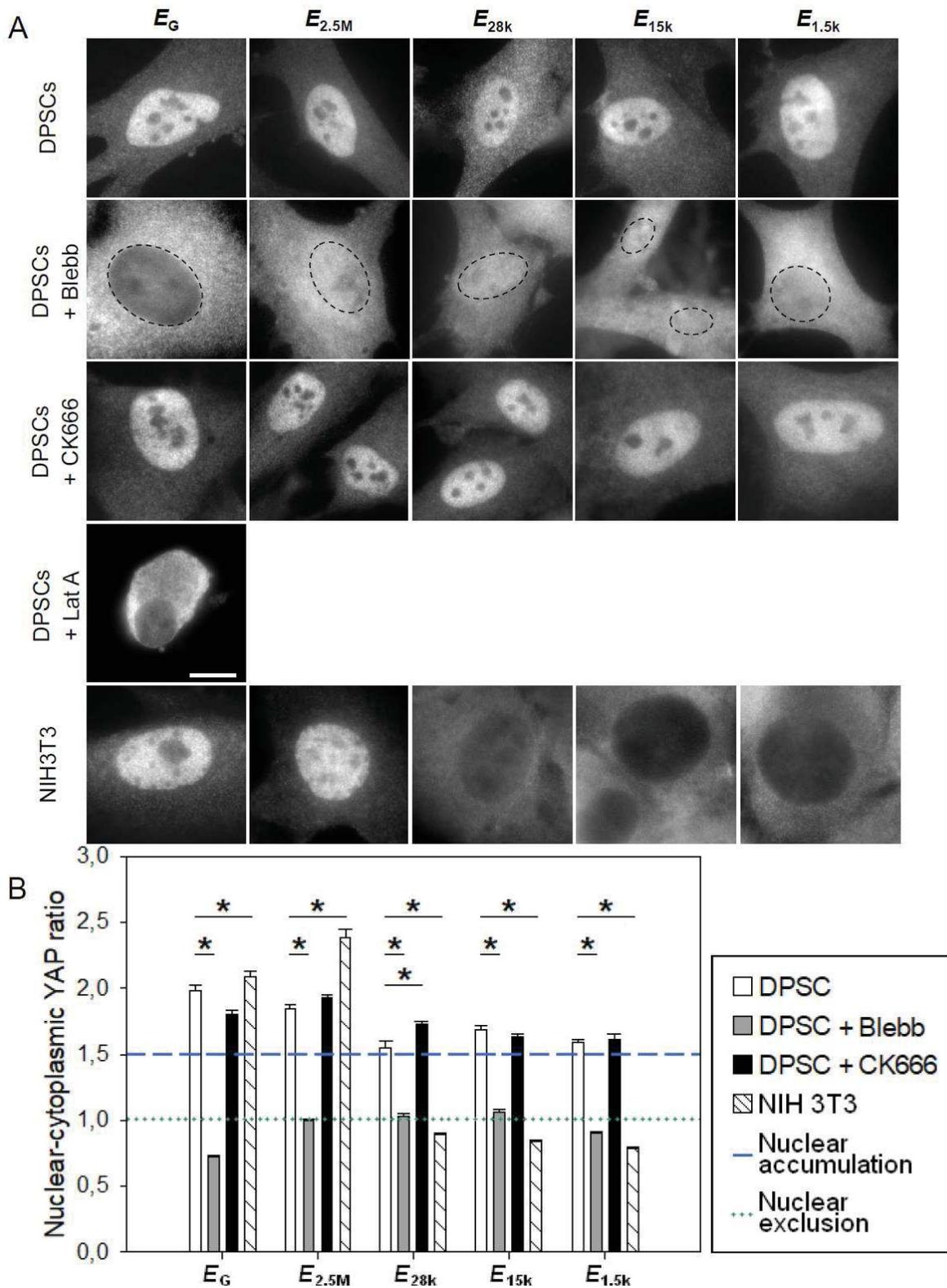


Figure 7. YAP localization with respect to substrate stiffness in DPSCs and NIH 3T3 cells. A) Representative images of DPSCs and NIH3T3 cells with anti-YAP immunostaining with no drug (line 1 and 5), with blebbistatin (line 2), with CK666 (line 3) and with latrunculin (line 4), Scale bar: 10 μ m. B) quantification of nucleocytoplasmic YAP ratio of DPSCs with and without drugs and NIH 3T3 cells.

3.7 Forced YAP nuclear entry does not increase the average speed of blebbistatine-treated DPSCs with respect to elastic modulus.

Since the average speed of DPSCs did not decrease in blebbistatine-treated cells, despite the cytoplasmic localization of YAP, we studied their migration speed when YAP was artificially maintained in the nucleus despite myosin II inhibition. Therefore, we forced the nuclear entry of YAP in presence of blebbistatin by treating the DPSCs with TSA, known to facilitate the accessibility of protein to chromatin [33, 34]. We chose to study the $E_{1.5k}$ condition where DPSCs have the highest average speed and E_G , for which nuclear exclusion of YAP in presence of blebbistatin is the most important. Nuclear areas of DPSCs seeded on $E_{1.5k}$ decreased when the cells were incubated with blebbistatin (Fig. 8A and 8B). Inversely, in presence of blebbistatin with TSA, nuclear areas increased notably on $E_{1.5k}$ (Fig. 8A and 8B). These results showed that TSA, despite the opposite effect of blebbistatin on the nuclear area, increased the nuclear volume. Interestingly, YAP accumulated in the nucleus even in presence of blebbistatin in TSA-treated cells (Fig. 8A, 8B and SI Fig. 5). Similarly, in presence of blebbistatin + TSA, RUNX2 was detected in the nucleus whereas it was excluded of the nucleus in presence of blebbistatin (SI Fig. 6). We investigated whether YAP enters the nuclei through the nuclear pores by incubating DPSCs with WGA in presence or not of TSA and/or blebbistatine. WGA is a lectin binding to proteins of the nuclear pore complex (NPC) and selectively blocking carrier-mediated transport without interfering with passive diffusion [35-37]. Incubation of DPSCs treated with blebbistatin and TSA with WGA completely prevented the nuclear accumulation of YAP (Fig. 8A and B). These results indicate that after myosin II inhibition by blebbistatin, TSA-dependent accumulation of YAP in nuclei involves a carrier-mediated transport mechanism through the NPC. The average speed of blebbistatin-treated DPSCs seeded on $E_{1.5k}$ remains unchanged even after forcing the nuclear localization of YAP with TSA (32 and 31.5 $\mu\text{m}/\text{h}$ respectively) (Fig. 8D to 8F). These results strongly suggest that the speed of DPSCs is independent of the intracellular localization of the YAP protein when myosin II is inhibited.

Figure 8

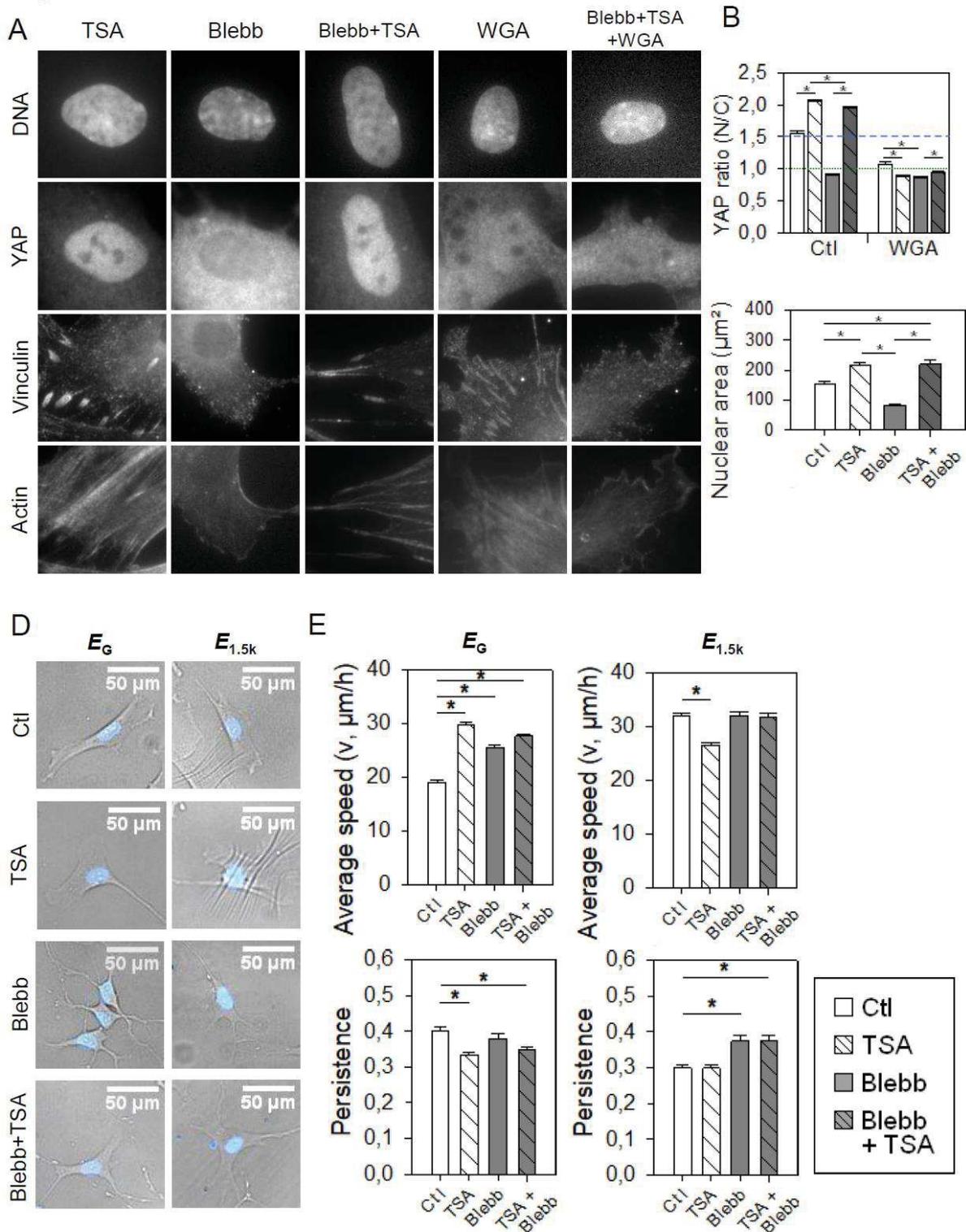


Figure 8. DPSCs migration after YAP nuclear translocation by histone acetylation. A) DPSCs cultured on $E_{1.5k}$ with TSA, blebb, blebb + TSA, WGA or blebb + TSA + WGA. Scale bar: 10 μm . B) quantification of nucleocytoplasmic YAP ratio of the DPSCs and quantitative data for nuclear areas (in μm^2) D) Time-lapse images monitoring representative images on E_G and $E_{1.5k}$, with no drug, blebb, TSA, Blebb + TSA. E) Average speed (in $\mu\text{m}/\text{h}$) and persistence (no unit).

3.7 DPSCs migrated from soft to stiff substrates and inversely independently of the myosin II activity and YAP localization

We have established that the average speed of DPSCs increases significantly when the substrate stiffness decreases and that this process is independent of the intracellular localization of YAP. We then studied if DPSCs migrate preferentially towards stiff or soft substrates. Therefore, we designed PDMS substrates with two stiffnesses: a low stiffness in the central region and with high stiffness in the peripheral region. The mechanical properties of the PDMS_{soft-stiff} were determined by rheology. Typical experimental data are plotted for two independently prepared E_{stiff} and E_{soft} samples in Figure 9A. The storage modulus versus frequency curves for all the samples are superimposed in Figure 9A. The Young Modulus of the soft and stiff areas was 35 kPa and 400 kPa respectively. The intracellular distribution of YAP was analyzed on DPSCs cultured on the central region and the stiff peripheral region of the PDMS_{soft-stiff}. We observed that YAP was localized within the nucleus for DPSCs seeded on both areas of the PDMS_{soft-stiff} (Fig. 9B and 9C). Nuclear accumulation of YAP was prevented after treatment with blebbistatine for E_{stiff} and E_{soft} (Fig. 9D). Observation of the migration of DPSCs seeded between E_{stiff} and E_{soft} showed that they do not adopt any preferential direction on these substrates. Indeed, the tracking of 200 DPSCs seeded on the PDMS_{soft-stiff} showed that 58.6% of the cells that come from E_{stiff} and touch the border, cross the boundary and migrate toward E_{soft} . The other 40% of the cells remain on E_{stiff} . Similarly, 47.6% of the cells seeded on E_{soft} that touch the border migrate toward E_{stiff} while the other 50.3% remain on E_{soft} (Fig. 9B and 9C). It should be noted that some DPSCs are able to move from a soft to hard region and back to the soft region and also move from hard to soft region and back to the hard region. These data revealed that DPSC migration between two mechanically different regions does not depend on a durotaxis mechanism. Conversely, 68.6% of the NIH 3T3 cells seeded on E_{soft} that touch the border cross the boundary while the other remained on E_{soft} . Interestingly, 98.1% of the NIH 3T3 cells coming from E_{stiff} and touching the border remains on E_{stiff} . Over the 200 tracked NIH 3T3 cells touching the border, only one was able to migrate from E_{stiff} toward E_{soft} . (Fig. 9B and 9D). These observations highlight the difference between NIH 3T3 cells and DPSCs, which showed an increased average speed on soft substrate and moved from stiff to soft region and inversely. Even though MSCs are classically described to migrate according to a process of durotaxis [38], DPSCs were able to migrate from stiff region to soft region. We then investigated if myosin II was required by DPSCs to migrate between E_{stiff} and E_{soft} . Thus, DPSCs were seeded PDMS_{soft-stiff} in the presence of blebbistatin. In the presence of blebbistatin an equivalent number of DPSCs migrate from stiff to soft regions and inversely, identically to the drug-free condition (Fig. 9B and 9C).

Figure 9

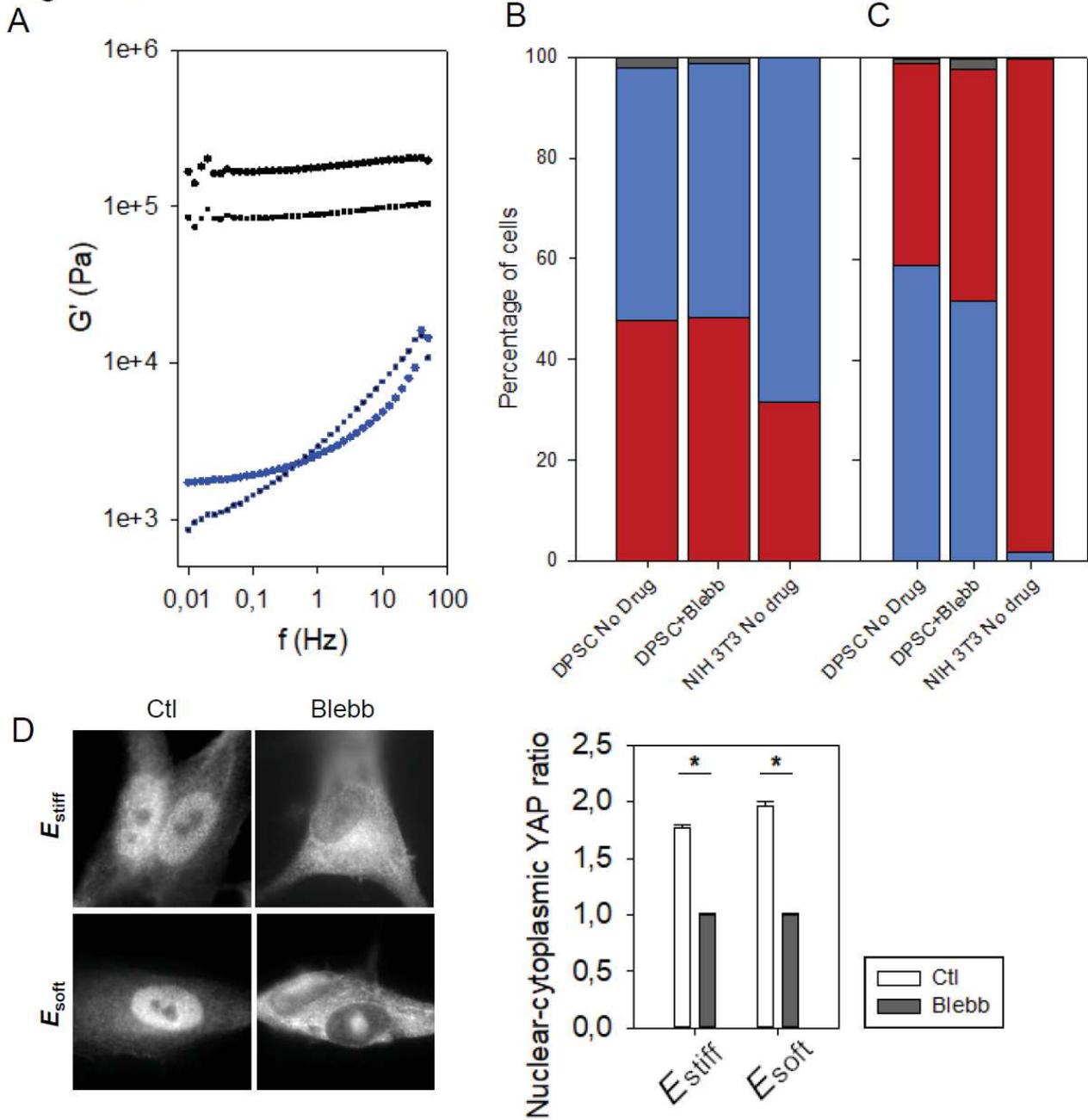


Figure 9. DPSCs migration on substrate presenting two stiffnesses with a 1/10 ratio. A) Storage moduli of the investigated samples versus frequency. The black symbols and blue symbols correspond to the «stiff» and «soft» samples respectively. B) Statistics of cells migrating from the soft substrate toward the stiff substrate. In red, percentage of cells that come from the soft part and cross the boundary. In blue, percentage of cells that do not migrate. In gray, cells with undefined movement. C) Statistics of cells migrating from the stiff part of the substrate. In red, percentage of cells that come from the stiff part and prefer to stay on it instead of crossing the boundary. In blue, percentage of cells that migrate toward the soft substrate. In gray, cells with undefined movement. D) Representative anti-YAP immunostained images of DPSCs on E_{stiff} and E_{soft} without drug or with myosin inhibition. Scale bar: 10 μ m and quantification of nucleocytoplasmic YAP ratio of DPSCs.

Moreover, in the presence of blebbistatin, YAP was retained in the cytoplasm of DPSCs localized either on E_{stiff} and E_{soft} . These results showed that DPSCs do not require the contractile myosin II activity to migrate between regions presenting different stiffnesses. In summary, our results suggest that myosin II activity and the intracellular localization of YAP are not essential for DPSCs migration between two different stiffnesses. In conclusion, our results seem to indicate that stiffness changes within the same substrate are not an obstacle for migration of DPSCs, which are able to move from a soft environment to a stiff environment or a stiff environment towards a soft environment. This suggests that in the absence of inflammation factors and soluble factors released by demineralization of dentin caused by tooth decay, DPSCs would be free to evolve on any stiffness without preferential direction. An extremely interesting perspective would be to investigate whether a chemical signal mimicking a pulpal inflammation could force the cell migration toward the stiff or the soft substrate, depending on the location of the signal.

4. Conclusion

The speed of the DPSCs increases as the rigidity of the substrate decreases. This increase in velocity is correlated with the size of the focal adhesions, which decreases concomitantly with the rigidity of the substrate. The speed of DPSCs is slightly increased in the presence of blebbistatin on stiff substrates and unchanged on soft substrates. This increase in velocity is correlated with a drastic decrease in the size of the focal adhesions under the effect of blebbistatin. In blebbistatin-treated DPSCs cultured on E_G and $E_{1.5k}$, YAP accumulated in cytoplasm and on $E_{2.5M}$, E_{28k} and E_{15k} YAP was uniformly distributed in the cytoplasm and in the nucleoplasm. However, the migration speed of the DPSCs is independent of the intracellular localization of YAP. Substrate presenting two various stiffnesses is not a barrier to DPSCs migration which are able to cross the boundary in both directions. This suggests that in the absence of inflammation factors and factors released by demineralization of dentin, DPSCs would be free to evolve in any mechanical space of rigidity without preferential direction.

References

- [1] I.F. Persoon, A.R. Ozok, Definitions and Epidemiology of Endodontic Infections, *Curr Oral Health Rep* 4(4) (2017) 278-285.
- [2] A. Chercoles-Ruiz, A. Sanchez-Torres, C. Gay-Escoda, Endodontics, Endodontic Retreatment, and Apical Surgery Versus Tooth Extraction and Implant Placement: A Systematic Review, *Journal of endodontics* 43(5) (2017) 679-686.
- [3] B. Toure, B. Faye, A.W. Kane, C.M. Lo, B. Niang, Y. Boucher, Analysis of reasons for extraction of endodontically treated teeth: a prospective study, *Journal of endodontics* 37(11) (2011) 1512-5.
- [4] J.W. Yang, Y.F. Zhang, C.Y. Wan, Z.Y. Sun, S. Nie, S.J. Jian, L. Zhang, G.T. Song, Z. Chen, Autophagy in SDF-1 α -mediated DPSC migration and pulp regeneration, *Biomaterials* 44 (2015) 11-23.
- [5] N. Kawashima, Characterisation of dental pulp stem cells: a new horizon for tissue regeneration?, *Arch Oral Biol* 57(11) (2012) 1439-58.
- [6] S. Shi, S. Gronthos, Perivascular niche of postnatal mesenchymal stem cells in human bone marrow and dental pulp, *J Bone Miner Res* 18(4) (2003) 696-704.
- [7] C. Rombouts, C. Jeanneau, A. Bakopoulou, I. About, Dental Pulp Stem Cell Recruitment Signals within Injured Dental Pulp Tissue, *Dent J (Basel)* 4(2) (2016).
- [8] I. About, M.J. Bottero, P. de Denato, J. Camps, J.C. Franquin, T.A. Mitsiadis, Human dentin production in vitro, *Exp Cell Res* 258(1) (2000) 33-41.
- [9] O. Tecles, P. Laurent, S. Zygouritsas, A.S. Burger, J. Camps, J. Dejou, I. About, Activation of human dental pulp progenitor/stem cells in response to odontoblast injury, *Arch Oral Biol* 50(2) (2005) 103-8.
- [10] B. Ozcan, E. Bayrak, C. Eriskan, Characterization of Human Dental Pulp Tissue Under Oscillatory Shear and Compression, *Journal of biomechanical engineering* 138(6) (2016) 061006.
- [11] T. Qu, J. Jing, Y. Ren, C. Ma, J.Q. Feng, Q. Yu, X. Liu, Complete pulpodentin complex regeneration by modulating the stiffness of biomimetic matrix, *Acta Biomater* 16 (2015) 60-70.
- [12] J.M. Garcia-Arcos, R. Chabrier, M. Deygas, G. Nader, L. Barbier, P.J. Saez, A. Mathur, P. Vargas, M. Piel, Reconstitution of cell migration at a glance, *J Cell Sci* 132(4) (2019).
- [13] S. Dupont, L. Morsut, M. Aragona, E. Enzo, S. Giullitti, M. Cordenonsi, F. Zanconato, J. Le Digabel, M. Forcato, S. Bicciato, N. Elvassore, S. Piccolo, Role of YAP/TAZ in mechanotransduction, *Nature* 474(7350) (2011) 179-83.
- [14] L. Valon, A. Marin-Llaurado, T. Wyatt, G. Charras, X. Trepat, Optogenetic control of cellular forces and mechanotransduction, *Nat Commun* 8 (2017) 14396.
- [15] B. Zhao, X. Ye, J. Yu, L. Li, W. Li, S. Li, J. Yu, J.D. Lin, C.Y. Wang, A.M. Chinnaiyan, Z.C. Lai, K.L. Guan, TEAD mediates YAP-dependent gene induction and growth control, *Genes Dev* 22(14) (2008) 1962-71.

- [16] T. Moroishi, C.G. Hansen, K.L. Guan, The emerging roles of YAP and TAZ in cancer, *Nature reviews. Cancer* 15(2) (2015) 73-79.
- [17] S.W. Plouffe, A.W. Hong, K.L. Guan, Disease implications of the Hippo/YAP pathway, *Trends in molecular medicine* 21(4) (2015) 212-22.
- [18] F. Zanconato, M. Cordenonsi, S. Piccolo, YAP/TAZ at the Roots of Cancer, *Cancer cell* 29(6) (2016) 783-803.
- [19] S. Porazinski, H. Wang, Y. Asaoka, M. Behrndt, T. Miyamoto, H. Morita, S. Hata, T. Sasaki, S.F.G. Krens, Y. Osada, S. Asaka, A. Momoi, S. Linton, J.B. Miesfeld, B.A. Link, T. Senga, N. Shimizu, H. Nagase, S. Matsuura, S. Bagby, H. Kondoh, H. Nishina, C.P. Heisenberg, M. Furutani-Seiki, YAP is essential for tissue tension to ensure vertebrate 3D body shape, *Nature* 521(7551) (2015) 217-221.
- [20] X. Varelas, The Hippo pathway effectors TAZ and YAP in development, homeostasis and disease, *Development* 141(8) (2014) 1614-26.
- [21] B. Zhao, L. Li, Q. Lei, K.L. Guan, The Hippo-YAP pathway in organ size control and tumorigenesis: an updated version, *Genes Dev* 24(9) (2010) 862-74.
- [22] M. Aragona, T. Panciera, A. Manfrin, S. Giulitti, F. Michielin, N. Elvassore, S. Dupont, S. Piccolo, A mechanical checkpoint controls multicellular growth through YAP/TAZ regulation by actin-processing factors, *Cell* 154(5) (2013) 1047-1059.
- [23] S.V. Plotnikov, A.M. Pasapera, B. Sabass, C.M. Waterman, Force fluctuations within focal adhesions mediate ECM-rigidity sensing to guide directed cell migration, *Cell* 151(7) (2012) 1513-27.
- [24] S. Gronthos, M. Mankani, J. Brahimi, P.G. Robey, S. Shi, Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo, *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(25) (2000) 13625-30.
- [25] K.A. DeMali, C.A. Barlow, K. Burridge, Recruitment of the Arp2/3 complex to vinculin: coupling membrane protrusion to matrix adhesion, *J Cell Biol* 159(5) (2002) 881-91.
- [26] S.W. Chan, C.J. Lim, K. Guo, C.P. Ng, I. Lee, W. Hunziker, Q. Zeng, W. Hong, A role for TAZ in migration, invasion, and tumorigenesis of breast cancer cells, *Cancer Res* 68(8) (2008) 2592-8.
- [27] D.E. Mason, J.M. Collins, J.H. Dawahare, T.D. Nguyen, Y. Lin, S.L. Voytik-Harbin, P. Zorlutuna, M.C. Yoder, J.D. Boerckel, YAP and TAZ limit cytoskeletal and focal adhesion maturation to enable persistent cell motility, *J Cell Biol* 218(4) (2019) 1369-1389.
- [28] S.M. Gorisch, M. Wachsmuth, K.F. Toth, P. Lichter, K. Rippe, Histone acetylation increases chromatin accessibility, *J Cell Sci* 118(Pt 24) (2005) 5825-34.
- [29] A. Bancaud, S. Huet, N. Daigle, J. Mozziconacci, J. Beaudouin, J. Ellenberg, Molecular crowding affects diffusion and binding of nuclear proteins in heterochromatin and reveals the fractal organization of chromatin, *EMBO J* 28(24) (2009) 3785-98.
- [30] L.I. Davis, The nuclear pore complex, *Annu Rev Biochem* 64 (1995) 865-96.
- [31] S.A. Rutherford, M.W. Goldberg, T.D. Allen, Three-dimensional visualization of the route of protein import: the role of nuclear pore complex substructures, *Exp Cell Res* 232(1) (1997) 146-60.

- [32] C. Ptak, J.D. Aitchison, R.W. Wozniak, The multifunctional nuclear pore complex: a platform for controlling gene expression, *Curr Opin Cell Biol* 28 (2014) 46-53.
- [33] L. Zheng, L. Zhang, L. Chen, J. Jiang, X. Zhou, M. Wang, Y. Fan, Static magnetic field regulates proliferation, migration, differentiation, and YAP/TAZ activation of human dental pulp stem cells, *J Tissue Eng Regen Med* 12(10) (2018) 2029-2040.
- [34] L.G. Vincent, Y.S. Choi, B. Alonso-Latorre, J.C. del Alamo, A.J. Engler, Mesenchymal stem cell durotaxis depends on substrate stiffness gradient strength, *Biotechnol J* 8(4) (2013) 472-84.
- [35] C. Yang, M.W. Tibbitt, L. Basta, K.S. Anseth, Mechanical memory and dosing influence stem cell fate, *Nat Mater* 13(6) (2014) 645-52.
- [36] A.R. Killaars, J.C. Grim, C.J. Walker, E.A. Hushka, T.E. Brown, K.S. Anseth, Extended Exposure to Stiff Microenvironments Leads to Persistent Chromatin Remodeling in Human Mesenchymal Stem Cells, *Adv Sci (Weinh)* 6(3) (2019) 1801483.
- [37] M. Rabineau, F. Flick, E. Mathieu, A. Tu, B. Senger, J.C. Voegel, P. Lavalle, P. Schaaf, J.N. Freund, Y. Haikel, D. Vautier, Cell guidance into quiescent state through chromatin remodeling induced by elastic modulus of substrate, *Biomaterials* 37 (2015) 144-55.
- [38] M. Rabineau, F. Flick, C. Ehlinger, E. Mathieu, I. Duluc, M. Jung, B. Senger, L. Kocgozlu, P. Schaaf, P. Lavalle, J.N. Freund, Y. Haikel, D. Vautier, Chromatin de-condensation by switching substrate elasticity, *Sci Rep* 8(1) (2018) 12655.

Supplemental data

SI Figure 1:

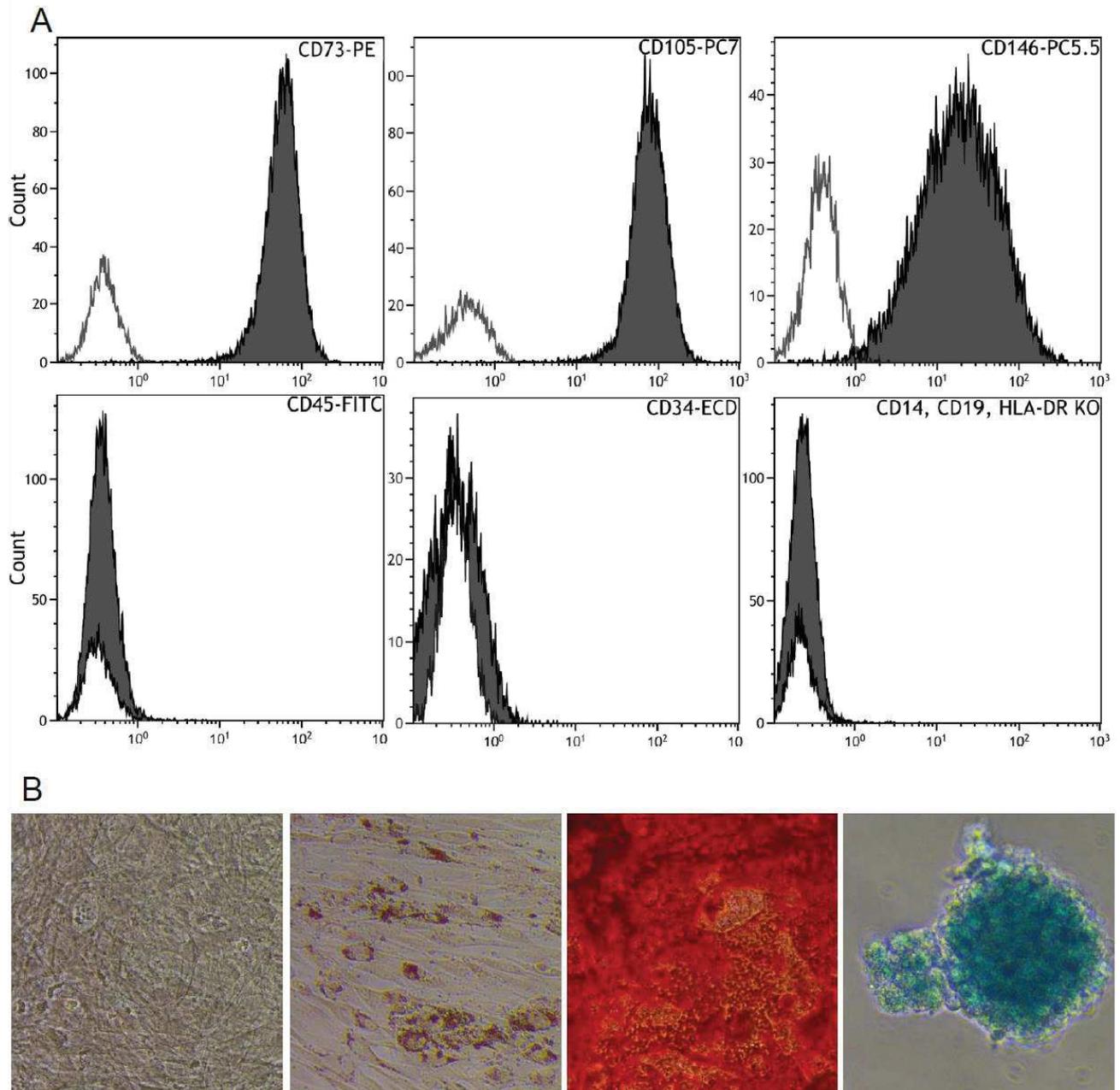


Figure S1. A) Level of expression of surface markers by flow cytometry. B) In vitro multidifferentiation after 3 weeks of culture in the appropriate medium (from left to right): for control, adipogenic, osteogenic and chondrocyte differentiation.

SI Figure 2:

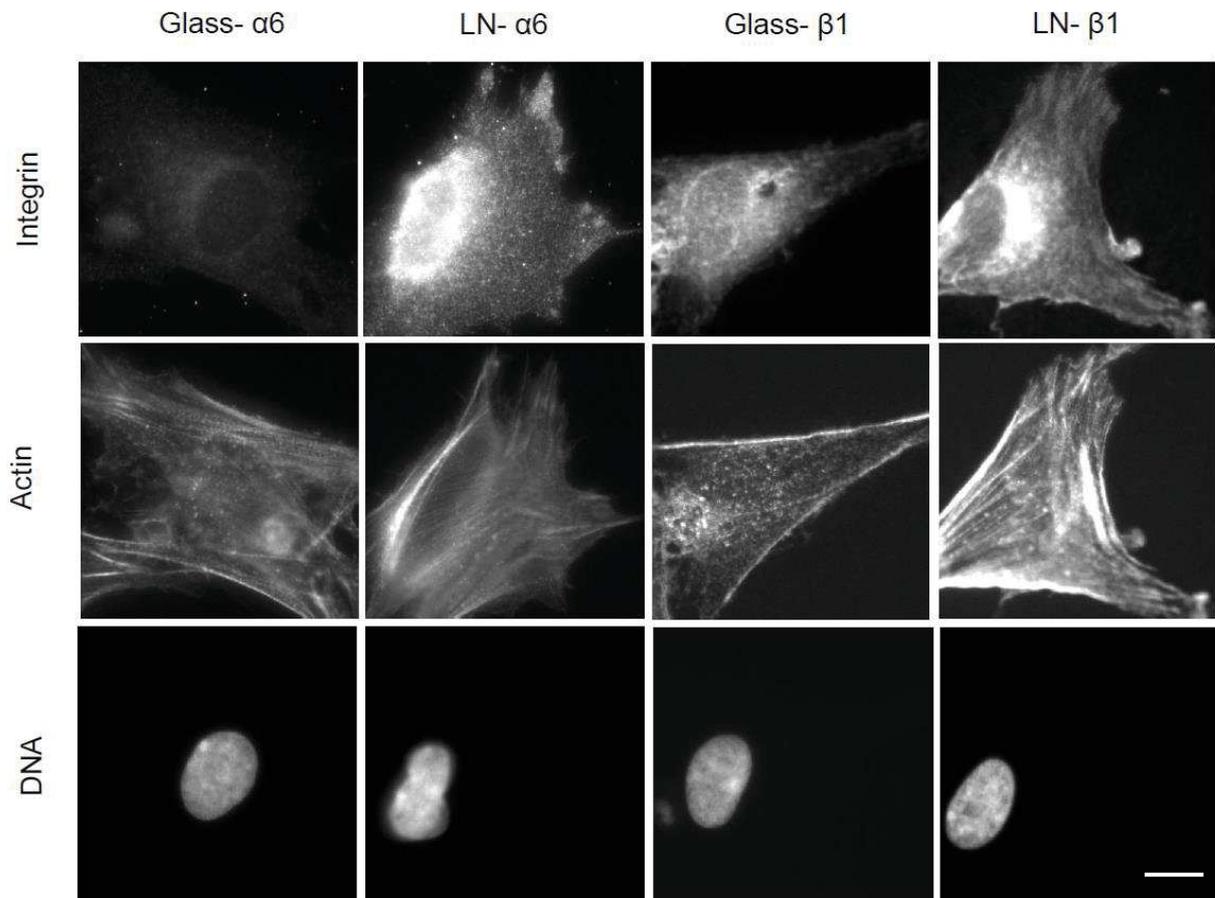


Figure S2. Representative images of DPSCs on *glass surfaces* treated or not with laminin immunostained with anti-integrin $\alpha 6$ or anti-integrin $\beta 1$, counterstained with phalloidin and Hoechst 33258. Scale bar: 10 μm .

SI Figure 3:

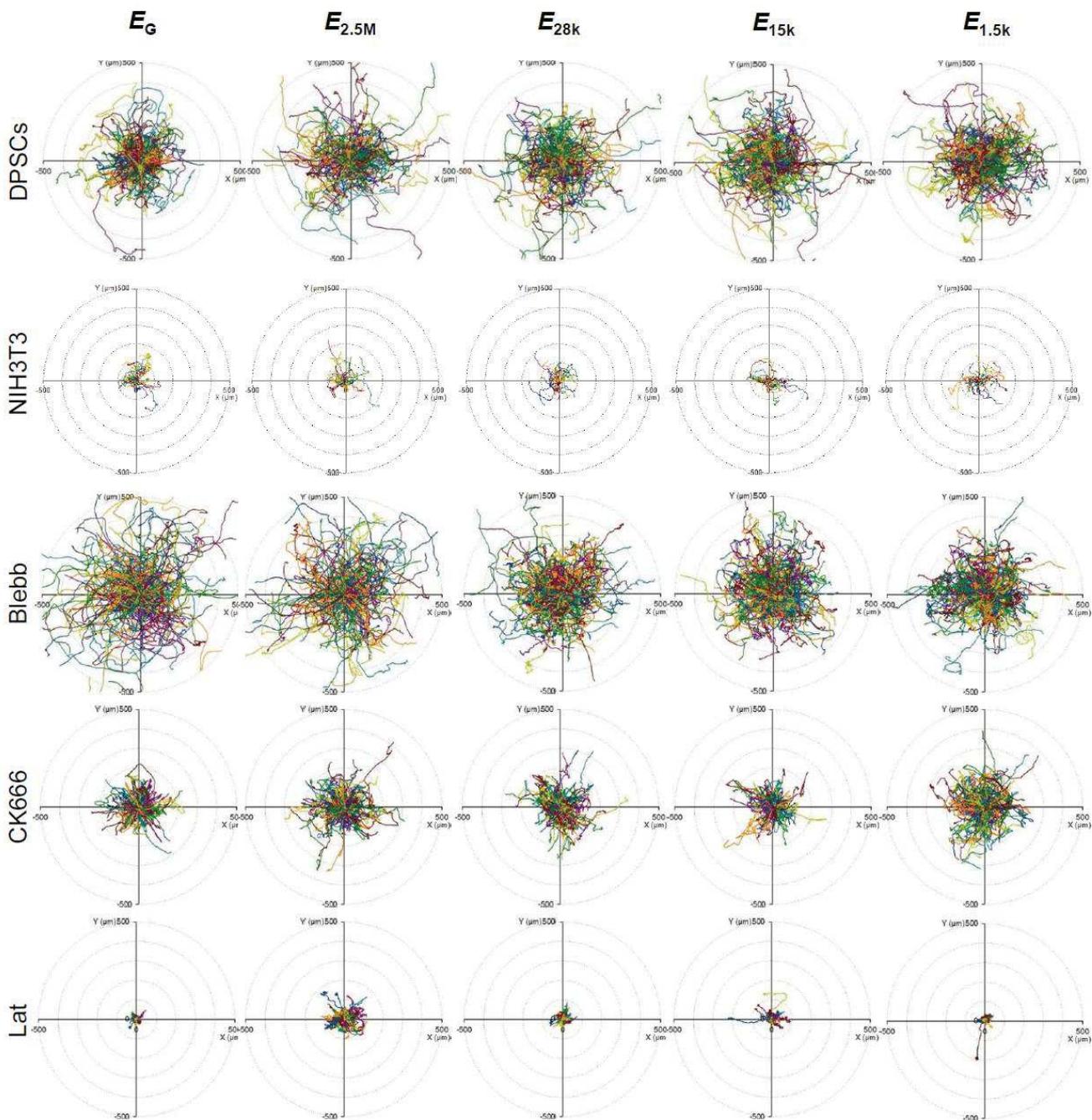


Figure S3. DPSCs and NIH 3T3 trajectories from different PDMS substrate stiffnesses. On lines 3, 4 and 5, DPSCs are inhibited either by blebbistatin, CK666 or latrunculin A.

SI Figure 4:

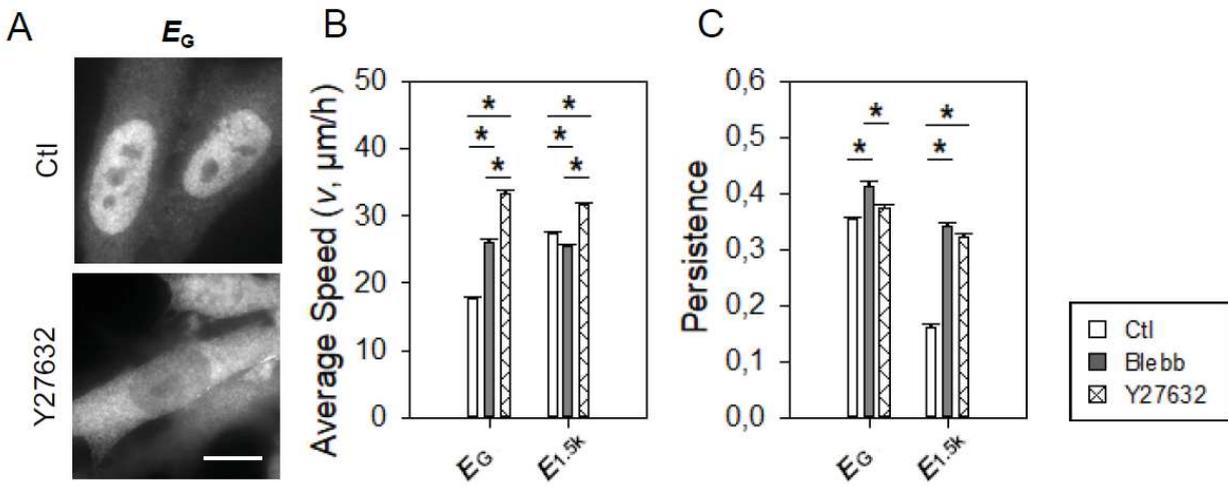


Figure S4. YAP localisation in DPSCs after inhibition of Rock by Y27632. A) Representative images of DPSCs on glass surface (E_G) with anti-YAP, inhibition by 100 μ M Y27632, Scale bar: 10 μ m. B) Average speed (in μ m/h), C) persistence (no unit) of DPSCs.

SI Figure 5:

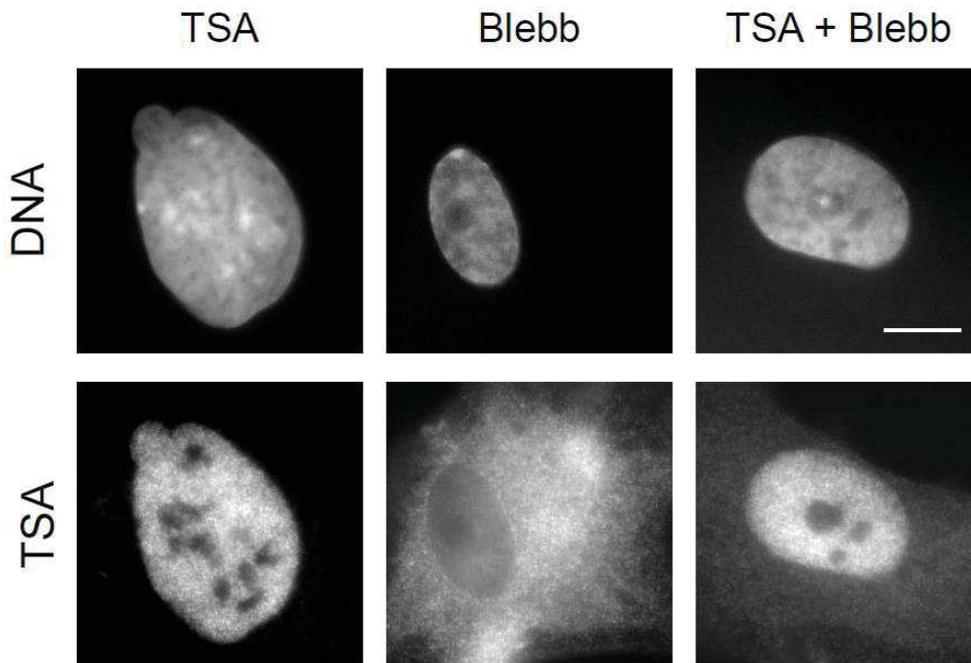


Figure S5. YAP localisation in DPSCs after inhibition of myosin II +TSA on glass surface (E_G) with blebbistatin, TSA or blebb + TSA, immunolabeled with anti-YAP counterstained with Hoechst 33258 for DNA and. Scale bar: 10 μ m.

SI Figure 6:

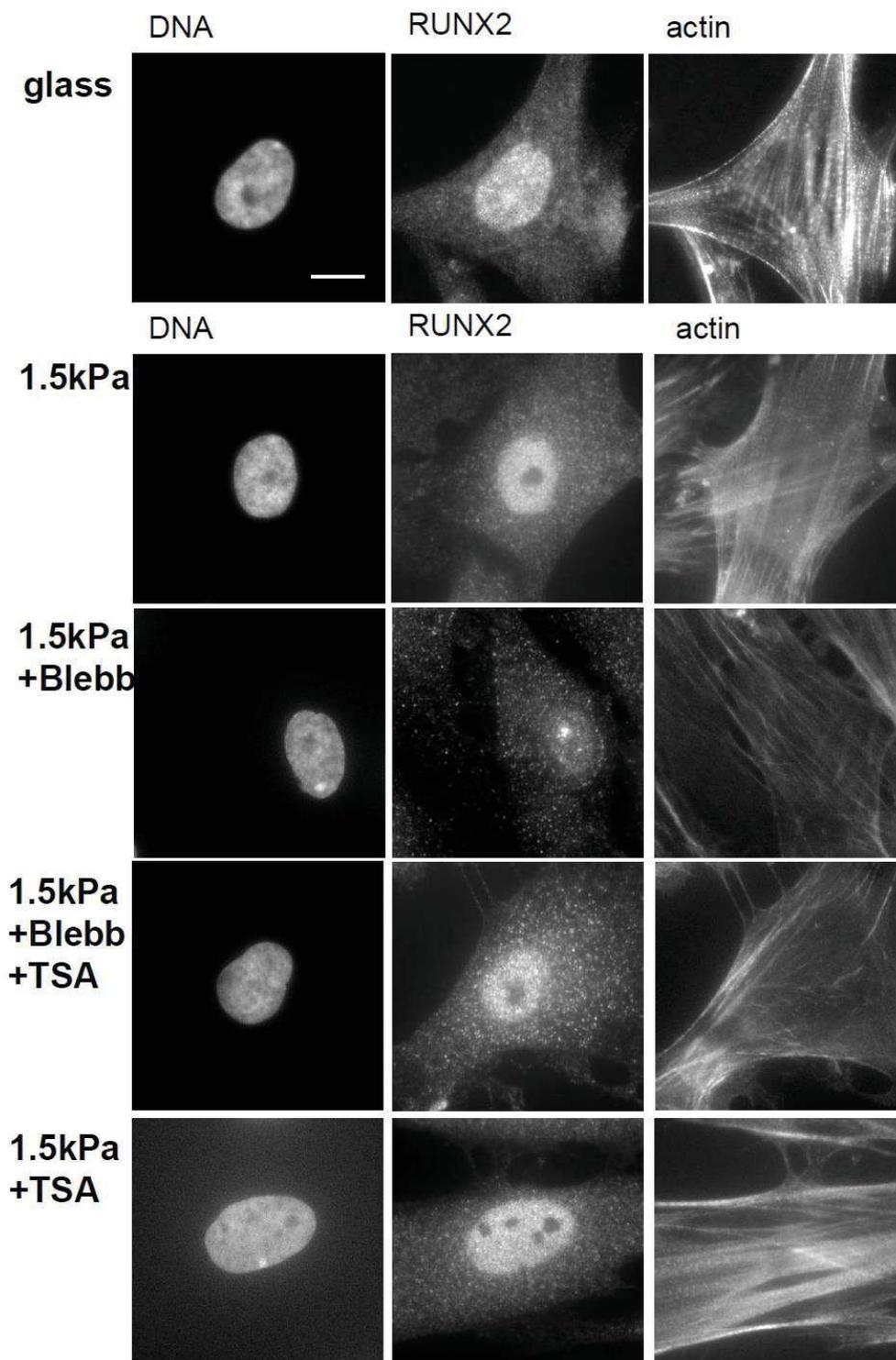


Figure S6: Activation of RUNX2 depending of the incubated drugs. Scale bar : 10 μ m.

5.3 Résumé

La première étape de ce travail a consisté à créer une banque de DPSCs et à vérifier qu'elles répondaient aux critères définis par l'ISCT (SI Figure 1). Nous avons ensuite choisi une protéine de revêtement pour permettre l'étude des DPSCs sur du PDMS. Puisque la laminine entraîne une vitesse de migration et une persistance des DPSCs plus élevées que la fibronectine et le collagène, nous avons choisi cette protéine de la MEC comme protéine de revêtement pour l'ensemble des surfaces étudiées (Figure 1). Nous avons par la suite montré que les cellules isolées sont capables de survivre et proliférer sans se différencier sur la gamme de rigidités étudiée (1,5 kPa à 2,5 MPa) (Figure 2). Malgré une viabilité cellulaire légèrement diminuée sur les substrats les plus mous (Figure 2A), les cellules sont capables de proliférer (Figure 2B) sur des matrices présentant différentes rigidités. Après une semaine de culture sur les matrices étudiées, les DPSCs expriment toujours les marqueurs de surface préalablement testés et leur taux d'expression correspondent à ceux définis par l'ISCT (Dominici *et al.* 2006) (Figure 2C). Ces résultats semblent confirmés par les observations au MET qui ne montrent pas de changement statistiquement significatif du pourcentage d'hétérochromatine en fonction des rigidités (Figure 2D).

Par la suite, nous avons observé que la vitesse de migration moyenne des DPSCs augmente lorsque le module de Young de la matrice diminue (Figure 3D). Cette augmentation est liée à une diminution de la taille des adhésions focales (Figure 3B et 3D). Enfin, la persistance des DPSCs ne semble pas influencée par la rigidité de la matrice (Figure 3D, SI Figure 3A). Ces observations sont en accord avec une étude similaire qui porte sur la migration de MSCs sur du PDMS (Saxena *et al.* 2018). Nos données contrastent avec les mesures réalisées sur les NIH 3T3 dont la vitesse moyenne de migration diminue et dont la persistance augmente sur les matrices molles (Figure 3E, SI Figure 3B). Dans notre étude, les DPSCs migrant sur les matrices présentant une rigidité inférieure ou égale à 28 kPa génèrent des déformations de surface qui créent des rides, visibles par l'observateur (Figure 2A). Pour les NIH 3T3, ces rides sont visibles uniquement à 1,5 kPa (Figure 3C)

Afin de comprendre le rôle du cytosquelette d'actine sur la migration des DPSCs, nous avons inhibé différents aspects de sa dynamique. L'inhibition de la polymérisation des filaments d'actine par la latrunculine A a empêché l'étalement et la migration des DPSCs sur toutes les rigidités (Figure 6A et 6B, SI Figure 3E). L'inhibition du complexe Arp2-3 par CK666 a entraîné un arrondissement temporaire des cellules qui se sont ensuite réétalées pour migrer avec une vitesse moyenne de

migration diminuée et une persistance inchangée (Figure 5A-5C, SI Figure 3D). Ce phénomène est associé à une augmentation de la taille des contacts focaux (Figure 5C). Ces résultats semblent cohérents avec une étude précédente qui montre que l'inhibition du complexe Arp2/3 par l'Arpin, n'empêche pas la formation de lamellipodes, mais entraîne la suppression des lamellipodes préexistants, suivie par la formation de nouveaux lamellipodes ectopiques (Dang *et al.* 2013). L'inhibition de la myosine II par la blebbistatine a entraîné une diminution de la taille des adhésomes sur toutes les rigidités (Figure 4 C). Ce phénomène s'est traduit par une vitesse moyenne de migration et une persistance inchangées sur les substrats les plus mous et augmentées sur les substrats les plus rigides (Figure 4A-4D et SI Figure 3C). Des résultats similaires ont été observés en inhibant indirectement la contraction de la myosine II par Y27632 (SI Figure 4).

Ces premiers résultats nous ont permis de montrer que les DPSCs s'adaptent à la rigidité de la matrice et que l'inhibition de la contraction cytosquelettique influence également leur comportement. YAP/TAZ étant des effecteurs très étudiés de la mécanotransduction dont l'entrée nucléaire est dépendante de l'intégrité du cytosquelette (Das *et al.* 2016), nous avons souhaité explorer leur distribution nucléocytoplasmique dans nos conditions expérimentales. De manière surprenante, YAP est nucléaire même dans les DPSCs ensemencées sur les substrats les plus mous, contrairement aux données de la littérature (Dupont *et al.* 2011) (Figure 7). Ces résultats contrastent avec les observations réalisées sur les NIH 3T3 où YAP est cytoplasmique pour des rigidités inférieures ou égales à 28 kPa (Figure 7). Par ailleurs, l'inhibition de la contraction de la myosine II par la blebbistatine a entraîné une diminution drastique du rapport nucléocytoplasmique de YAP qui n'est pas décrite dans la littérature (Das *et al.* 2016, Killaars *et al.* 2018) (Figure 7). A l'inverse, l'inhibition du complexe Arp2/3 par CK666 n'a pas modifié la localisation de YAP, alors que la latrunculine A a entraîné son exclusion nucléaire, ce qui est en accord avec la littérature actuelle (Aragona *et al.* 2013) (Figure 7).

La migration des DPSCs semble donc dépendante de la rigidité de la matrice et de la contraction de l'actomyosine, mais pas de la distribution nucléocytoplasmique de YAP puisque leur vitesse moyenne de migration est inchangée sur les substrats mous en présence ou absence de blebbistatine. Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons forcé l'entrée de YAP dans le noyau par de la TSA, qui inhibe la désacétylation de la chromatine par les HDACs. Après avoir confirmé de la localisation nucléaire de YAP en présence de TSA, en présence ou non de blebbistatine, nous avons observé la migration des DPSCs (Figure 8A et B et SI Figure 5). Sur les substrats mous, l'incubation avec de la TSA entraîne une diminution de la vitesse de migration des DPSCs. En revanche, l'incubation de TSA

avec la blebbistatine ne change pas la vitesse de migration par rapport à la blebbistatine seule (Figure 8E). La localisation nucléaire de YAP ne semble donc pas influencer la migration des DPSCs sur les matrices de faible rigidité. Sur du verre, la présence de TSA augmente la vitesse de migration (Figure 8E). Cette observation pourrait être liée à une étude récente qui montre que la présence de YAP/TAZ dans le noyau induit un rétrocontrôle en diminuant la contraction de l'actomyosine et permettant la migration (Mason *et al.* 2019). L'inhibition chimique de la contraction de la myosine II par la blebbistatine n'entraîne pas d'augmentation supplémentaire de la vitesse de migration (Figure 8E). A nouveau, la vitesse de migration des DPSCs ne semble pas dépendante de la distribution nucléocytoplasmique de YAP.

Dans la dernière partie de cette thèse, j'ai conçu des matrices en PDMS présentant une partie périphérique rigide et une partie centrale molle. Ces matrices ont été caractérisées en rhéométrie (Figure 9A). Nos résultats ont montré que le PDMS rigide (E_{stiff}) présente un module de Young de 400 kPa et la matrice molle (E_{soft}) un module de Young de 35 kPa. Ce rapport de rigidité de 1/10 entre matrice molle et rigide correspond au rapport des constantes de raideur utilisé dans une étude similaire (Trichet *et al.* 2012). Dans notre étude, les DPSCs sont capables de migrer entre les deux rigidités sans direction préférentielle (Figure 9B et 9C). Ce phénomène a été observé lorsque YAP était nucléaire et lorsque YAP était maintenu dans le cytoplasme grâce à de la blebbistatine (Figure 9D). Ces résultats contrastent avec l'étude de Trichet *et al.* (2012) qui montre que les cellules préfèrent migrer du mou vers le dur sur une large gamme de rigidités. Cette tendance s'atténue néanmoins sur des matrices présentant des rigidités élevées, avec toujours un rapport des modules de Young de 1/10, sur lesquelles les cellules n'ont plus de direction préférentielle. Dans cette étude, la rigidité des matrices est exprimée en constante de raideur, ce qui rend les résultats difficiles à comparer avec ceux de notre étude. Néanmoins, le comportement des NIH 3T3 qui montrent une rigidité préférentielle (mou vers dur) sur les matrices utilisées semble indiquer que le seuil de rigidité évoqué dans l'article de 2012 n'a pas été dépassé (Figure 9B et 9C).

Conclusion générale et perspectives

Cette thèse apporte des résultats surprenants sur la migration des DPSCs. En effet, nos observations montrent que la vitesse moyenne des DPSCs augmente sensiblement lorsque le module de Young de la matrice diminue. En revanche, la distribution nucléocytoplasmique de YAP ne varie pas en fonction de la rigidité de la matrice. De plus, la vitesse de migration des DPSCs sur les matrices E_G et $E_{1.5k}$ ne varie pas lorsque YAP est maintenu dans le noyau ou le cytoplasme par TSA ou blebbistatine. Par ailleurs, dans nos conditions expérimentales, les DPSCs n'adoptent pas de direction préférentielle lorsqu'elles sont ensemencées entre deux matrices de rigidités différentes.

Nos résultats soulèvent des questions intéressantes sur les mécanismes de mécanotransduction des DPSCs. En effet, les DPSCs semblent capables de prolonger l'activation de certains gènes en maintenant les facteurs de transcription YAP/TAZ dans le noyau sur des substrats plus mous que ceux classiquement décrits dans la littérature (Dupont *et al.* 2011, Elosegui-Artola *et al.* 2017, Killars *et al.* 2018). Ces résultats ne peuvent pas être expliqués par une éventuelle perte de sensibilité des DPSCs due à un passage tardif. En effet, Rao *et al.* (2018) ont étudié l'influence du passage sur la mécanosensibilité des MSCs et ont montré que YAP se déplaçait vers le cytoplasme lorsque les cellules étaient transférées sur des hydrogels mous ($E \sim 1$ kPa) jusqu'au 7^{ème} passage. Nos cellules n'ayant pas été utilisées au-delà du 7^{ème} passage, ce paramètre ne paraît pas pertinent pour expliquer cette différence. Nos résultats pourraient s'expliquer par l'exposition prolongée des DPSCs à des matrices rigides lors de la phase d'expansion qui pourrait induire une mémoire mécanique des cellules souches, empêchant la localisation nucléocytoplasmique de YAP/TAZ lorsque ces cellules sont à nouveau exposées à des matrices molles. Ce phénomène a récemment été décrit sur des MSCs (Killaars *et al.* 2018). Dans ce modèle, YAP devient nucléaire lorsque les cellules sont ensemencées sur des matrices molles après une courte phase d'expansion sur des substrats rigides, mais reste cytoplasmique lorsqu'elles sont cultivées sur des matrices rigides de manière prolongée avant d'être transférées sur des substrats mous (Killaars *et al.* 2018). Ces données récentes doivent néanmoins être prises avec précaution. En effet, les auteurs constatent que leurs cellules avaient été cultivées sur une matrice rigide pendant 10 jours lors de leur expansion et que cette période n'a pas été prise en compte pour évaluer la mémoire mécanique. De plus, toutes les cellules étudiées dans la littérature ont été cultivées sur des matrices rigides avant expérimentation sans pour autant empêcher la localisation cytoplasmique de YAP sur les substrats mous (Dupont *et al.* 2011, Foster *et al.* 2014, Elosegui-Artola *et al.* 2017).

Outre l'influence de la mémoire mécanique sur la distribution nucléocytoplasmique de YAP/TAZ, l'étude de Killaars *et al.* (2018) a également montré une corrélation entre la décondensation de la chromatine et la distribution nucléocytoplasmique de YAP/TAZ. Cette corrélation a également fait l'objet d'un questionnement complémentaire de ce travail de thèse. En effet, l'ensemencement des cellules sur un substrat rigide induit un étalement du noyau, un étirement de la membrane nucléaire et donc un élargissement des pores nucléaires qui facilite l'importation nucléaire de YAP/TAZ (Elosegui-Artola *et al.* 2017). Ce phénomène est corrélé à la décondensation de la chromatine par acétylation des histone (Killaars *et al.* 2018). Nous avons souhaité déterminer si la décondensation de la chromatine induite par l'inhibition des HDACs avec de la TSA pouvait également permettre une entrée de YAP/TAZ dans le noyau. Dans ces conditions, la décondensation de la chromatine ne serait plus une conséquence de l'étalement nucléaire, mais sa cause. Afin de répondre à cette question nous avons provoqué l'hyperacétylation des histones avec de la TSA puis nous avons fixé les DPSCs pour les observer au MET et en microscopie à fluorescence. Nous avons également utilisé la blebbistatine pour observer la chromatine et les pores nucléaires lorsque YAP/TAZ sont exclus du noyau. La microscopie à fluorescence a montré que le volume nucléaire est augmenté en présence de TSA et diminué en présence de blebbistatine. Les analyses MET sont actuellement en cours de réalisation. Nous espérons montrer qu'en présence de TSA, le pourcentage d'euchromatine est augmenté par rapport aux cellules contrôles et que ce phénomène entraîne une augmentation de la taille des pores nucléaires. A l'inverse, nous pensons que la diminution de la taille du noyau et l'hypoacétylation des histones décrites dans la littérature en présence de blebbistatine (Killaars *et al.* 2018) sont liées à une diminution de la taille des pores nucléaires. Ces données manquantes pourraient étayer des hypothèses formulées précédemment selon lesquelles la taille des pores nucléaires influence l'importation de YAP/TAZ (Elosegui-Artola *et al.* 2017) et que l'hétérochromatine accumulée en périphérie du noyau pourrait s'opposer au transport de certaines macromolécules (Görisch *et al.* 2005).

Concernant le rôle du cytosquelette d'actine et de la rigidité des matrices dans la migration des DPSCs, nos résultats semblent étayer l'hypothèse qu'il existe un équilibre spécifique entre adhésions focales et contraction, qui permettrait d'atteindre une vitesse cellulaire optimale (Gupton et Waterman-Storer 2006). Il est possible que les adhésomes plus longs observés sur les substrats rigides expliquent la vitesse moyenne de migration diminuée des DPSCs. Il semble alors cohérent que la diminution de la taille des contacts focaux et de la contraction cellulaire, objectivées par l'absence de rides sur toutes les rigidités en présence de blebbistatine, aient moins d'impact sur la migration des DPSCs sur les substrats mous, auxquels elles adhèrent moins bien que sur les substrats rigides, sur lesquels elles sont plus étalées (Saxena *et al.* 2018).

Bien que les DPSCs migrent plus rapidement sur les substrats mous, elles n'adoptent pas de direction préférentielle lorsqu'elles sont ensemencées entre une matrice rigide et une matrice molle. Ces résultats laissent à penser que l'activation et la migration des DPSCs serait principalement contrôlée par des facteurs solubles. Ces résultats sont cohérents avec les événements qui se déroulent lorsqu'une carie profonde se développe à proximité d'une pulpe vitale. Dans ce cas, la déminéralisation de la dentine et la réaction inflammatoire provoquées par la carie entraînent la libération de facteurs solubles qui activent les DPSCs et entraînent leur migration puis leur différenciation au niveau du site lésé. Ces résultats sont également en accord avec une étude récente sur la migration des MSCs qui montre que la vitesse de MSCs est augmentée en présence de facteurs chimiotactiques et que ce chimiotactisme est accentué sur les matrices de faibles rigidités (Saxena *et al.* 2018). Cette différence a été expliquée par une adhésion plus faible aux substrats mous, que nous avons également retrouvée dans ce travail, et un taux de protrusion de la membrane cellulaire plus élevé (Saxena *et al.* 2018).

L'interprétation de nos résultats à la lumière de la littérature actuelle laisse supposer que les matrices de faibles rigidités seraient propices à l'ingénierie tissulaire dentaire. En effet, elles permettent la survie et la prolifération des DPSCs sans induire leur différenciation. De plus, une étude récente a montré que la culture de MSCs sur des hydrogels mous ($E \sim 1$ kPa) pouvait rétablir certaines caractéristiques perdues lors de la sénescence cellulaire comme l'expression de marqueurs de surfaces caractéristiques de cellules souches et la sécrétion de cytokines (Rao *et al.* 2018). L'utilisation de matrices de faibles rigidités présente également l'avantage technique de faciliter leur injection dans l'espace canalaire.

Une perspective de cette thèse est de poursuivre le questionnement sur la mémoire mécanique et l'influence de la rigidité de la matrice sur la sénescence des DPSCs en développant des techniques de culture prolongées sur des matrices de faible rigidité qui seraient mises en place dès l'isolation des DPSCs. Cet axe de recherche pourrait permettre d'explorer d'avantage le maintien du phénotype des cellules souches et leur capacité d'adaptation en fonction de leur historique de culture. Une autre perspective intéressante serait d'étudier la migration des DPSCs, en intégrant un signal mimant l'inflammation sur les différentes parties des matrices PDMS birigidités conçues précédemment. Ainsi, nous pourrions observer par des expériences de vidéomicroscopie si l'intégration d'un signal chimiotactique dans la zone rigide ou molle de cette matrice entraîne une migration préférentielle des cellules dans cette direction.

Nos résultats, loin de répondre à toutes nos interrogations, ouvrent donc des perspectives de recherche passionnantes à développer.

Références bibliographiques

- About I, Bottero MJ, de Denato P, Camps J, Franquin JC, Mitsiadis TA. Human dentin production in vitro. *Exp Cell Res.* 2000;258:33–41.
- Alongi DJ, Yamaza T, Song Y *et al.* Stem/progenitor cells from inflamed human dental pulp retain tissue regeneration potential. *Regen Med.* 2010;5(4):617-631.
- Amano M, Nakayama M, Kaibuchi K. Rho-kinase/ROCK: A key regulator of the cytoskeleton and cell polarity. *Cytoskeleton.* 2010;67(9):545-554.
- American Association of Endodontists. Consensus Conference Recommended Diagnostic Terminology. *J Endod* 2009;35:1634.
- Ananthakrishnan R, Ehrlicher A. The forces behind cell movement. *Int J Biol Sci.* 2007;3(5):303-317.
- Anderson LR, Owens TW, Naylor MJ. Structural and mechanical functions of integrins. *Biophys Rev.* 2014;6(2):203-213.
- Angele P, Schumann D, Angele M, *et al.* Cyclic, mechanical compression enhances chondrogenesis of mesenchymal progenitor cells in tissue engineering scaffolds. *Biorheology.* 2004;4:335-346.
- Annibali S, Bellavia D, Ottolenghi L, *et al.* Micro-CT and PET analysis of bone regeneration induced by biodegradable scaffolds as carriers for dental pulp stem cells in a rat model of calvarial "critical size" defect: Preliminary data. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2014;102(4):815-825.
- Aragona M, Panciera T, Manfrin A, *et al.* A mechanical checkpoint controls multicellular growth through YAP/TAZ regulation by actin-processing factors. *Cell.* 2013;154(5):1047-1059.
- Arthur A, Shi S, Zannettino AC, Fujii N, Gronthos S, Koblar SA. Implanted adult human dental pulp stem cells induce endogenous axon guidance. *Stem Cells.* 2009;27(9):2229-2237.

- Baker BM, Shah RP, Huang AH, Mauck RL. Dynamic tensile loading improves the functional properties of mesenchymal stem cell-laden nanofiber-based fibrocartilage. *Tissue Eng Part A*. 2011;17:1445-1455.
- Batouli S, Miura M, Brahim J, *et al*. Comparison of stem-cell-mediated osteogenesis and dentinogenesis. *J Dent Res*. 2003;82(12):976-981.
- Becker JS, Nicetto D, Zaret KS. H3K9me3-Dependent Heterochromatin: Barrier to Cell Fate Changes. *Trends Genet*. 2016;32(1):29-41.
- Bhonde RR, Sheshadri P, Sharma S, Kumar A. Making surrogate β -cells from mesenchymal stromal cells: perspectives and future endeavors. *Int J Biochem Cell Biol*. 2014;46:90-102.
- Boopathy G, Hong W. Role of Hippo Pathway-YAP/TAZ Signaling in Angiogenesis. *Front Cell Dev Biol*. 2019;7:49.
- Caplan DJ, Pankow JS, Cai J, Offenbacher S, Beck JD. The relationship between self-reported history of endodontic therapy and coronary heart disease in the Atherosclerosis Risk in Communities Study. *J Am Dent Assoc*. 2009;140(8):1004-12.
- Carnevale G, Riccio M, Pisciotta A, *et al*. In vitro differentiation into insulin-producing β -cells of stem cells isolated from human amniotic fluid and dental pulp. *Dig Liver Dis*. 2013;45(8):669-676.
- Chalisserry EP, Nam SY, Park SH, Anil S. Therapeutic potential of dental stem cells. *J Tissue Eng*. 2017;8:2041731417702531.
- Chan SW, Lim CJ, Loo LS, Chong YF, Huang C, Hong W. TEADs mediate nuclear retention of TAZ to promote oncogenic transformation. *J Biol Chem*. 2009;284(21):14347-14358.
- Chércoles-Ruiz A, Sánchez-Torres A, Gay-Escoda C. Endodontics, Endodontic Retreatment, and Apical Surgery Versus Tooth Extraction and Implant Placement: A Systematic Review. *J Endod*. 2017;43(5):679-686.
- Cho YA, Noh K, Jue SS, Lee SY, Kim EC. Melatonin promotes hepatic differentiation of human dental pulp stem cells: clinical implications for the prevention of liver fibrosis. *J Pineal Res*. 2015;58(1):127-135.
- Coué M, Brenner SL, Spector I, Korn ED. Inhibition of actin polymerization by latrunculin A. *FEBS Lett*. 1987;213(2):316-318.

- D'Aquino R, Graziano A, Sampaolesi M, *et al.* Human postnatal dental pulp cells co-differentiate into osteoblasts and endotheliocytes: a pivotal synergy leading to adult bone tissue formation. *Cell Death Differ.* 2007;14(6):1162-1171.
- d'Aquino R, De Rosa A, Lanza V, *et al.* Human mandible bone defect repair by the grafting of dental pulp stem/progenitor cells and collagen sponge biocomplexes. *Eur Cell Mater.* 2009;12:75-83.
- Dahl KN, Ribeiro AJ, Lammerding J. Nuclear shape, mechanics, and mechanotransduction. *Circ Res.* 2008;102(11):1307-1318.
- Dang I, Gorelik R, Sousa-Blin C, *et al.* Inhibitory signalling to the Arp2/3 complex steers cell migration. *Nature.* 2013;503(7475):281-284.
- Dartevelle P, Ehlinger C, Zaet A, *et al.* D-Cateslytin: a new antifungal agent for the treatment of oral *Candida albicans* associated infections. *Sci Rep.* 2018;8(1):9235.
- Das A, Fischer RS, Pan D, Waterman CM. YAP Nuclear Localization in the Absence of Cell-Cell Contact Is Mediated by a Filamentous Actin-dependent, Myosin II- and Phospho-YAP-independent Pathway during Extracellular Matrix Mechanosensing. *J Biol Chem.* 2016;291(12):6096-6110.
- Del Rio A, Perez-Jimenez R, Liu R, Roca-Cusachs P, Fernandez JM, Sheetz MP. Stretching single talin rod molecules activates vinculin binding. *Science.* 2009;323(5914):638-641.
- Demali KA, Barlow CA, Burridge K. Recruitment of the Arp2/3 complex to vinculin: coupling membrane protrusion to matrix adhesion. *J Cell Biol.* 2002;159(5):881-891.
- Demarco FF, Casagrande L, Zhang Z, *et al.* Effects of morphogen and scaffold porogen on the differentiation of dental pulp stem cells. *J Endod.* 2010;36(11):1805-1811.
- Dokmanovic M, Clarke C, Marks PA. Histone deacetylase inhibitors: overview and perspectives. *Mol Cancer Res.* 2007;5(10):981-989.
- Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, *et al.* Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytherapy.* 2006;8(4):315-317.
- Downing TL, Soto J, Morez C, *et al.* Biophysical regulation of epigenetic state and cell reprogramming. *Nat Mater.* 2013;12(12):1154-1162.
- Du Y, Montoya C, Orrego S, *et al.* Topographic cues of a novel bilayered scaffold modulate dental pulp stem cells differentiation by regulating YAP signalling through cytoskeleton adjustments. *Cell Prolif.* 2019;19:12676.

Duncan HF, Kobayashi Y, Shimizu E. Growth Factors and Cell Homing in Dental Tissue Regeneration. *Curr Oral Health Rep.* 2018;5(4):276-285.

Dupont S, Morsut L, Aragona M, *et al.* Role of YAP/TAZ in mechanotransduction. *Nature.* 2011;474(7350):179-183.

Dupont S. Role of YAP/TAZ in cell-matrix adhesion-mediated signalling and mechanotransduction. *Exp Cell Res.* 2016;343(1):42-53.

El Karim I, Kennedy J, Hussey D. The antimicrobial effects of root canal irrigation and medication. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2007;103:560–569.

Elosegui-Artola A, Oria R, Chen Y, *et al.* Mechanical regulation of a molecular clutch defines force transmission and transduction in response to matrix rigidity. *Nat Cell Biol.* 2016;18(5):540-548.

Elosegui-Artola A, Andreu I, Beedle AEM, *et al.* Force Triggers YAP Nuclear Entry by Regulating Transport across Nuclear Pores. *Cell.* 2017;171(6):1397-1410.

Engler AJ, Sen S, Sweeney HL, Discher DE. Matrix elasticity directs stem cell lineage specification. *Cell.* 2006;126(4):677-689.

Evans M, Davies JK, Sundqvist G, Figdor D. Mechanisms involved in the resistance of *Enterococcus faecalis* to calcium hydroxide. *Int Endod J.* 2002;35(3):221-228.

Faix J, Rottner K. The making of filopodia. *Curr Opin Cell Biol.* 2006;18(1):18-25.

Fedorova E, Zink D. Nuclear architecture and gene regulation. *Biochim Biophys Acta.* 2008;1783(11):2174-84.

Felsenfeld G, Groudine M. Controlling the double helix. *Nature.* 2003;421(6921):448-453.

Foster JW, Jones RR, Bippes CA, Gouveia RM, Cannon CJ. Differential nuclear expression of Yap in basal epithelial cells across the cornea and substrates of differing stiffness. *Exp Eye Res.* 2014;127:37-41.

Fouad AF. The microbial challenge to pulp regeneration. *Adv Dent Res.* 2011;23(3):285-9.

- Gagliardi PA, Puliafito A, di Blasio L, *et al.* Real-time monitoring of cell protrusion dynamics by impedance responses. *Sci Rep.* 2015;15;5:10206.
- Galbraith CG, Yamada KM, Galbraith JA. Polymerizing actin fibers position integrins primed to probe for adhesion sites. *Science.* 2007;315(5814):992-995.
- Galler KM, D'Souza RN, Hartgerink JD, Schmalz G. Scaffolds for dental pulp tissue engineering. *Adv Dent Res.* 2011;23(3):333-339.
- Galler KM, Hartgerink JD, Cavender AC, Schmalz G, D'Souza RN. A customized self-assembling peptide hydrogel for dental pulp tissue engineering. *Tissue Eng Part A.* 2012;18:176-184.
- Galler KM, Eidt A, Schmalz G. Cell-free approaches for dental pulp tissue engineering. *J Endod.* 2014;40(4):S41-45.
- Galler KM, Krast G, Simon S, *et al.* European Society of Endodontology position statement: Revitalization procedures. *Int Endod J.* 2016;49(8):717-723.
- Galler KM, Widbiller M. Perspectives for Cell-homing Approaches to Engineer Dental Pulp. *J Endod.* 2017;43(9):S40-S45.
- Garcia-Arcos JM, Chabrier R, Deygas M, *et al.* Reconstitution of cell migration at a glance. *J Cell Sci.* 2019;132(4): 225565.
- Gaspar-Maia A, Alajem A, Meshorer E, Ramalho-Santos M. Open chromatin in pluripotency and reprogramming. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2011;12(1):36-47.
- Geiger B, Spatz JP, Bershadsky AD. Environmental sensing through focal adhesions. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2009;10(1):21-33.
- Gong T, Heng BC, Lo EC, Zhang C. Current Advance and Future Prospects of Tissue Engineering Approach to Dentin/Pulp Regenerative Therapy. *Stem Cells Int.* 2016;2016:9204574.
- Gorelik R, Gautreau A. Quantitative and unbiased analysis of directional persistence in cell migration *Nature Protocols.* 2014;9:1931–1943.
- Görisch SM, Wachsmuth M, Tóth KF, Lichter P, Rippe K. Histone acetylation increases chromatin accessibility. *J Cell Sci.* 2005;118(24):5825-5834.
- Govindasamy V, Ronald VS, Abdullah AN, *et al.* Differentiation of dental pulp stem cells into islet-like aggregates. *J Dent Res.* 2011;90(5):646-652.
- Graziano A, d'Aquino R, Laino G, Papaccio G. Dental pulp stem cells: a promising tool for bone regeneration. *Stem Cell Rev.* 2008;4(1):21-26.
- Gronthos S, Mankani M, Brahimi J, Robey PG, Shi S. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2000;97:13625–13630.

Gupton SL, Waterman-Storer CM. Spatiotemporal feedback between actomyosin and focal-adhesion systems optimizes rapid cell migration. *Cell*. 2006;125(7):1361-1374.

Haapasalo M, Endal U, Zandi H, Coil JM. Eradication of endodontic infection by instrumentation and irrigation solutions. *Endod Top*. 2005;10:77–102.

Hargreaves KM, Goodis HE, editors. *Seltzer and Bender's dental pulp*. 3rd ed. Carol Stream, IL, USA: Quintessence Publishing; 2002.

Hargreaves KM, Diogenes A, Teixeira FB. Treatment options: biological basis of regenerative endodontic procedures. *Pediatr Dent*. 2013;35(2):129-140.

Harris AK, Wild P, Stopak D. Silicone rubber substrata: a new wrinkle in the study of cell locomotion. *Science*. 1980;208(4440):177-179.

Hashmi B, Mammoto T, Weaver J, *et al*. Mechanical induction of dentin-like differentiation by adult mouse bone marrow stromal cells using compressive scaffolds. *Stem Cell Res*. 2017;24:55-60.

Haute Autorité de Santé. *Traitement endodontique, Rapport d'évaluation technologique*. 2008.

He H, Yu J, Liu Y, *et al*. Effects of FGF2 and TGFbeta1 on the differentiation of human dental pulp stem cells in vitro. *Cell Biol Int*. 2008;32(7):827-834.

Heo SJ, Han WM, Szczesny SE, *et al*. Mechanically Induced Chromatin Condensation Requires Cellular Contractility in Mesenchymal Stem Cells. *Biophys J*. 2016;111(4):864-874.

Hetrick B, Han MS, Helgeson LA, Nolen BJ. Small molecules CK666 and CK869 inhibit actin-related protein 2/3 complex by blocking an activating conformational change. *Chem Biol*. 2013;20(5):701-712.

Heissler SM, Manstein DJ. Nonmuscle myosin-2: Mix and match. *Cell Mol Life Sci*. 2013;70:1–21.

Henson JH, Yeterian M, Weeks RM, *et al*. Arp2/3 complex inhibition radically alters lamellipodial actin architecture, suspended cell shape, and the cell spreading process. *Mol Biol Cell*. 2015;26(5):887-900.

Heyeraas KJ, Kvinnsland I. Tissue pressure and blood flow in pulpal inflammation. *Proc Finn Dent Soc* 1982;88(1):S393–401.

Hilkens P, Gervois P, Fanton Y, *et al*. Effect of isolation methodology on stem cell properties and multilineage differentiation potential of human dental pulp stem cells. *Cell Tissue Res*. 2013;353(1):65-78.

Hilkens P, Meschi N, Lambrechts P, Bronckaers A, Lambrechts I. Dental Stem Cells in Pulp Regeneration: Near Future or Long Road Ahead? *Stem Cells Dev*. 2015;24(14):1610-1622.

Hong JH, Hwang ES, McManus MT, *et al.* TAZ, a transcriptional modulator of mesenchymal stem cell differentiation. *Science*. 2005;309(5737):1074-1078.

Huang AH, Chen YK, Lin LM, Shieh TY, Chan AW. Isolation and characterization of dental pulp stem cells from a supernumerary tooth. *J Oral Pathol Med*. 2008;37(9):571-574.

Huang GT, Yamaza T, Shea LD, *et al.* Stem/progenitor cell-mediated de novo regeneration of dental pulp with newly deposited continuous layer of dentin in an in vivo model. *Tissue Eng Part A*. 2010;16(2):605-615.

Hülsmann M. Epidemiology of post-treatment disease. *Endod Topics*. 2016;34(1): 42-63.

Hynes RO. Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell* 2002;110:673–687.

Ikeda E, Yagi K, Kojima M, *et al.* Multipotent cells from the human third molar: feasibility of cell-based therapy for liver disease. *Differentiation*. 2008;76(5):495-505.

Iohara K, Zheng L, Ito M, *et al.* Regeneration of dental pulp after pulpotomy by transplantation of CD31(-)/CD146(-) side population cells from a canine tooth. *Regen Med*. 2009;4(3):377-385.

Iohara K, Imabayashi K, Ishizaka R, *et al.* Complete pulp regeneration after pulpectomy by transplantation of CD105+ stem cells with stromal cell-derived factor-1. *Tissue Eng Part A*. 2011;17:1911-1920.

Iohara K, Murakami M, Takeuchi N, *et al.* A novel combinatorial therapy with pulp stem cells and granulocyte colony-stimulating factor for total pulp regeneration. *Stem Cells Transl Med*. 2013;2(7):521-533.

Itoh Y, Sasaki JI, Hashimoto M, Katata C, Hayashi M, Imazato S. Pulp Regeneration by 3-dimensional Dental Pulp Stem Cell Constructs. *J Dent Res*. 2018;97(10):1137-1143.

Jones JV, Mansour M, James H, Sadi D, Carr RI. A substrate amplification system for enzyme-linked immunoassays II. Demonstration of its applicability for measuring anti-DNA antibodies. *J Immunol Methods*. 1989;118(1):79-84.

- Kanafi MM, Rajeshwari YB, Gupta S, *et al.* Transplantation of islet-like cell clusters derived from human dental pulp stem cells restores normoglycemia in diabetic mice. *Cytherapy*. 2013;15(10):1228-1236.
- Kassianidou E, Kalita J, Lim RYH. The role of nucleocytoplasmic transport in mechanotransduction. *Exp Cell Res*. 2019;377:86-93.
- Kawashima N. Characterisation of dental pulp stem cells: a new horizon for tissue regeneration? *Arch Oral Biol*. 2012;57(11):1439-1458.
- Killaars AR, Grim JC, Walker CJ, Hushka EA, Brown TE, Anseth KS. Extended Exposure to Stiff Microenvironments Leads to Persistent Chromatin Remodeling in Human Mesenchymal Stem Cells. *Adv Sci*. 2018;6(3):1801483.
- Kim JY, Xin X, Moiola EK, *et al.* Regeneration of dental-pulp-like tissue by chemotaxis-induced cell homing. *Tissue Eng Part A*. 2010;16(10):3023-3031.
- Kim SG, Zheng Y, Zhou J, *et al.* Dentin and dental pulp regeneration by the patient's endogenous cells. *Endod Topics*. 2013;28(1):106-117.
- Kofler M, Speight P, Little D, Di Ciano-Oliveira C, Szászi K, Kapus A. Mediated nuclear import and export of TAZ and the underlying molecular requirements. *Nat Commun*. 2018;9(1):4966.
- Kouzarides T. Chromatin modifications and their function. *Cell*. 2007;128(4):693-705.
- Kovács M, Tóth J, Hetényi C, Málnási-Csizmadia A, Sellers JR. Mechanism of blebbistatin inhibition of myosin II. *J Biol Chem*. 2004;279(34):35557-35563.
- Ladoux B, Nicolas A. Physically based principles of cell adhesion mechanosensitivity in tissues. *Rep Prog Phys*. 2012;75(11):116601.
- Laino G, d'Aquino R, Graziano A, *et al.* A new population of human adult dental pulp stem cells: a useful source of living autologous fibrous bone tissue (LAB). *J Bone Miner Res*. 2005;20(8):1394-1402.
- Lauffenburger DA, Horwitz AF. Cell migration: a physically integrated molecular process. *Cell*. 1996;84(3):359-369.
- Ledesma-Martínez E, Mendoza-Núñez VM, Santiago-Osorio E. Mesenchymal Stem Cells Derived from Dental Pulp: A Review. *Stem Cells Int*. 2016;2016:4709572.
- Lemaître C, Bickmore WA. Chromatin at the nuclear periphery and the regulation of genome functions. *Histochem Cell Biol*. 2015;144(2):111-122.

- Levental I, Georges PC, Janmey PA. Soft biological materials and their impact on cell function. *Soft Matter* 2007;3:299-306.
- Lima SMF, de Pádua GM, Sousa MGDC, Freire MS, Franco OL, Rezende TMB. Antimicrobial peptide-based treatment for endodontic infections--biotechnological innovation in endodontics. *Biotechnol Adv.* 2015;33(1):203-213.
- Lindroos B, Mäenpää K, Ylikomi T, Oja H, Suuronen R, Miettinen S. Characterisation of human dental stem cells and buccal mucosa fibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun.* 2008;368(2):329-335.
- Liu Z, van Grunsven LA, van Rossen E, *et al.* Blebbistatin inhibits contraction and accelerates migration in mouse hepatic stellate cells. *Br. J. Pharmacol.* 2010;159,304-315.
- Louvrier A, Euvrard E, Nicod L, *et al.* Odontoblastic differentiation of dental pulp stem cells from healthy and carious teeth on an original PCL-based 3D scaffold. *Int Endod J.* 2018;51(4):S252-263.
- Lu Q, Pandya M, Rufaihah AJ, *et al.* Modulation of Dental Pulp Stem Cell Odontogenesis in a Tunable PEG-Fibrinogen Hydrogel System. *Stem Cells Int.* 2015;2015:525367.
- Mana-Capelli S, Paramasivam M, Dutta S, McCollum D. Angiomotins link F-actin architecture to Hippo pathway signaling. *Mol Biol Cell.* 2014;25(10):1676-85.
- Manfredi M, Figini L, Gagliani M, Lodi G. Single versus multiple visits for endodontic treatment of permanent teeth. *Cochrane Database Syst Rev.* 2016;12:CD005296.
- Maraldi T, Riccio M, Pisciotta A, *et al.* Human amniotic fluid-derived and dental pulp-derived stem cells seeded into collagen scaffold repair critical-size bone defects promoting vascularization. *Stem Cell Res Ther.* 2013;4(3):53.
- Morotomi T, Washio A, Kitamura C. Current and future options for dental pulp therapy. *Jpn Dent Sci Rev.* 2019;55(1):5-11.
- Martens W, Bronckaers A, Politis C, Jacobs R, Lambrichts I. Dental stem cells and their promising role in neural regeneration: an update. *Clin Oral Investig.* 2013;17(9):1969-1983.
- Mason DE, Collins JM, Dawahare JH, *et al.* YAP and TAZ limit cytoskeletal and focal adhesion maturation to enable persistent cell motility. *J Cell Biol.* 2019;218(4):1369-1389.
- Mattila PK, Lappalainen P. Filopodia: molecular architecture and cellular functions. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2008;9(6):446-454.

- Matsubara T, Suardita K, Ishii M, *et al.* Alveolar bone marrow as a cell source for regenerative medicine: differences between alveolar and iliac bone marrow stromal cells. *J Bone Miner Res.* 2005;20(3):399-409.
- McBeath R, Pirone DM, Nelson CM, Bhadriraju K, Chen CS. Cell shape, cytoskeletal tension, and RhoA regulate stem cell lineage commitment. *Dev Cell.* 2004;6(4):483-495.
- Mead B, Logan A, Berry M, Leadbeater W, Scheven BA. Intravitreally transplanted dental pulp stem cells promote neuroprotection and axon regeneration of retinal ganglion cells after optic nerve injury. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2013;54(12):7544-7556.
- Meng Z, Moroishi T, Guan KL. Mechanisms of Hippo pathway regulation. *Genes Dev.* 2016;30(1):1-17.
- Mita T, Furukawa-Hibi Y, Takeuchi H, *et al.* Conditioned medium from the stem cells of human dental pulp improves cognitive function in a mouse model of Alzheimer's disease. *Behav Brain Res.* 2015;293:189-197.
- Miura M, Gronthos S, Zhao M, *et al.* SHED: stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2003;100(10):5807-5812.
- Mohammadi Z, Dummer PM. Properties and applications of calcium hydroxide in endodontics and dental traumatology. *Int Endod J.* 2011;44:697-730.
- Morszeck C, Götz W, Schierholz J, *et al.* Isolation of precursor cells (PCs) from human dental follicle of wisdom teeth. *Matrix Biol.* 2005;24(2):155-165.
- Mullins RD, Heuser JA, Pollard TD. The interaction of Arp2/3 complex with actin: Nucleation, high affinity pointed end capping, and formation of branching networks of filaments. *Proc Natl Acad Sci.* 1998;95:6181–6186.
- Nair PN. On the causes of persistent apical periodontitis: a review. *Int Endod J.* 2006;39(4):249-81.
- Nair PR, Wirtz D. Enabling migration by moderation: YAP/TAZ are essential for persistent migration. *J Cell Biol.* 2019;218(4):1092-1093.
- Nakashima M. Tissue engineering in endodontics. *Aust Endod J.* 2005;31(3):111-113.
- Nakashima M, Iohara K, Sugiyama M. Human dental pulp stem cells with highly angiogenic and neurogenic potential for possible use in pulp regeneration. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2009;20: 435–440.
- Nakashima M, Iohara K. Regeneration of dental pulp by stem cells. *Adv Dent Res.* 2011;23(3):313-319.

Nakashima M, Iohara K. Mobilized dental pulp stem cells for pulp regeneration: initiation of clinical trial. *J Endod.* 2014;40(4):S26-32.

Nakashima M, Iohara K, Murakami M, *et al.* Pulp regeneration by transplantation of dental pulp stem cells in pulpitis: a pilot clinical study. *Stem Cell Res Ther.* 2017;8(1):61.

Nemir S, West JL. Synthetic materials in the study of cell response to substrate rigidity. *Ann Biomed Eng.* 2010;38:2-20.

Nesti C, Pardini C, Barachini S, *et al.* Human dental pulp stem cells protect mouse dopaminergic neurons against MPP+ or rotenone. *Brain Res.* 2011;1367:94-102.

Nolen BJ, Tomasevic N, Russell A, *et al.* Characterization of two classes of small molecule inhibitors of Arp2/3 complex. *Nature.* 2009;460(7258):1031-1034.

Nosrat IV, Widenfalk J, Olson L, Nosrat CA. Dental pulp cells produce neurotrophic factors, interact with trigeminal neurons in vitro, and rescue motoneurons after spinal cord injury. *Dev Biol.* 2001;238(1):120-132.

Ozcan B, Bayrak E, Erisken C. Characterization of Human Dental Pulp Tissue Under Oscillatory Shear and Compression. *J Biomech Eng.* 2016;138(6):061006.

Paquette L, Legner M, Fillery ED, Friedman S. Antibacterial efficacy of chlorhexidine gluconate intracanal medication in vivo. *Endod.* 2007;33(7):788-795.

Parsons JT, Horwitz AR, Schwartz MA. Cell adhesion: integrating cytoskeletal dynamics and cellular tension. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2010;11(9):633-643.

Pathak A, Kumar S. Independent regulation of tumor cell migration by matrix stiffness and confinement. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 2012;109:10334-10339.

Peh GS, Adnan K, George BL, *et al.* The effects of Rho-associated kinase inhibitor Y-27632 on primary human corneal endothelial cells propagated using a dual media approach. *Sci Rep.* 2015;5:9167.

Pellegrin S, Mellor H. Actin stress fibres. *J Cell Sci.* 2007;120(20):3491-3499.

Persoon IF, Özok AR. Definitions and Epidemiology of Endodontic Infections. *Curr Oral Health Rep.* 2017;4:278-285.

- Plotnikov SV, Pasapera AM, Sabass B, Waterman CM. Force fluctuations within focal adhesions mediate ECM-rigidity sensing to guide directed cell migration. *Cell*. 2012;151(7):1513-27.
- Plouffe SW, Lin KC, Moore JL, *et al*. The Hippo pathway effector proteins YAP and TAZ have both distinct and overlapping functions in the cell. *J Biol Chem*. 2018;293(28):11230-11240.
- Pollard TD, Borisy GG. Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments. *Cell*. 2003;112:453–465.
- Pollard TD, Cooper JA. Actin, a central player in cell shape and movement. *Science*. 2009;326(5957):1208-1212.
- Pollard TD. Actin and actin-binding proteins. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2016;8:a018226.
- Prescott RS, Alsanea R, Fayad MI, *et al*. In vivo generation of dental pulp-like tissue by using dental pulp stem cells, a collagen scaffold, and dentin matrix protein 1 after subcutaneous transplantation in mice. *J Endod*. 2008;34(4):421-426.
- Qu T, Jing J, Ren Y, *et al*. Complete pulpodentin complex regeneration by modulating the stiffness of biomimetic matrix. *Acta Biomater*. 2015;16:60-70.
- Rabineau M, Flick F, Mathieu E, *et al*. Cell guidance into quiescent state through chromatin remodeling induced by elastic modulus of substrate. *Biomaterials*. 2015:144-55.
- Rabineau M, Flick F, Ehlinger C, *et al*. Chromatin de-condensation by switching substrate elasticity. *Sci Rep*. 2018;8(1):12655.
- Radek KA, Lopez-Garcia B, Hupe M, *et al*. The neuroendocrine peptide catestatin is a cutaneous antimicrobial and induced in the skin after injury. *J Invest Dermatol*. 2008;128(6):1525-1534.
- Rao VV, Vu MK, Ma H, Killaars AR, Anseth KS. Rescuing mesenchymal stem cell regenerative properties on hydrogel substrates post serial expansion. *Bioeng Transl Med*. 2018;4(1):51-60.
- Roman B, Verhasselt S, Stevens C. The Medicinal Chemistry and Use of Myosin II Inhibitor (S)-Blebbistatin and Its Derivatives. *Journal of Medicinal Chemistry*. 2018:61.
- Rombouts C, Jeanneau C, Bakopoulou A, About I. Dental Pulp Stem Cell Recruitment Signals within Injured Dental Pulp Tissue. *Dent J*. 2016;4(2):8.
- Rosa V, Zhang Z, Grande RH, Nör JE. Dental pulp tissue engineering in full-length human root canals. *J Dent Res* 2013;92:970–975.

- Saatchi M, Shokraneh A, Navaei H, Maracy MR, Shojaei H. Antibacterial effect of calcium hydroxide combined with chlorhexidine on *Enterococcus faecalis*: a systematic review and meta-analysis. *J Appl Oral Sci.* 2014;22(5):356-635.
- Sakai K, Yamamoto A, Matsubara K, *et al.* Human dental pulp-derived stem cells promote locomotor recovery after complete transection of the rat spinal cord by multiple neuro-regenerative mechanisms. *J Clin Invest.* 2012;122(1):80-90.
- Sasaki R, Aoki S, Yamato M, *et al.* PLGA artificial nerve conduits with dental pulp cells promote facial nerve regeneration. *J Tissue Eng Regen Med.* 2011;5(10):823-830.
- Saxena N, Mogha P, Dash S, Majumder A, Jadhav S, Sen S. Matrix elasticity regulates mesenchymal stem cell chemotaxis. *J Cell Sci.* 2018;131(7):211391.
- Scheller EL, Krebsbach PH, Kohn DH. Tissue engineering: state of the art in oral rehabilitation. *J Oral Rehabil.* 2009;36(5):368-389.
- Schoenwaelder SM, Burridge K. Bidirectional signaling between the cytoskeleton and integrins. *Curr Opin Cell Biol.* 1999;11(2):274-286.
- Seo BM, Miura M, Gronthos S, *et al.* Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament. *Lancet.* 2004;364(9429):149-155.
- Serrels B, Serrels A, Brunton VG, *et al.* Focal adhesion kinase controls actin assembly via a FERM-mediated interaction with the Arp2/3 complex. *Nat Cell Biol.* 2007;9(9):1046-1056.
- Shi S, Gronthos S. Perivascular niche of postnatal mesenchymal stem cells in human bone marrow and dental pulp. *J. Bone Miner. Res.* 2003;18:696-704.
- Sit ST, Manser E. Rho GTPases and their role in organizing the actin cytoskeleton. *J Cell Sci.* 2011;124(5):679-683.
- Small JV, Isenberg G, Celis JE. Polarity of actin at the leading edge of cultured cells. *Nature.* 1978;272:638-639.
- Spector I, Shochet NR, Kashman Y, Groweiss A. Latrunculins: novel marine toxins that disrupt microfilament organization in cultured cells. *Science.* 1983;219(4584):493-495.
- Sonoyama W, Liu Y, Fang D, *et al.* Mesenchymal stem cell-mediated functional tooth regeneration in swine. *PLoS One.* 2006;1:e79.
- Straight AF, Cheung A, Limouze J, *et al.* Dissecting temporal and spatial control of cytokinesis with a myosin II Inhibitor. *Science.* 2003;299(5613):1743-1747.
- Suchánek J, Visek B, Soukup T, *et al.* Stem cells from human exfoliated deciduous teeth--isolation, long term cultivation and phenotypical analysis. *Acta Medica.* 2010;53(2):93-99.

Sudol M. Yes-associated protein (YAP65) is a proline-rich phosphoprotein that binds to the SH3 domain of the Yes proto-oncogene product. *Oncogene*. 1994;9(8):2145-2152.

Sugiyama M, Iohara K, Wakita H, *et al*. Dental pulp-derived CD31⁻/CD146⁻ side population stem/progenitor cells enhance recovery of focal cerebral ischemia in rats. *Tissue Eng Part A*. 2011;17:1303-1311.

Sweeney HL, Holzbaun ELF. Motor Proteins. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2018;10(5):a021931.

Syamaladevi DP, Spudich JA, Sowdhamini R. Structural and functional insights on the Myosin superfamily. *Bioinform Biol Insights*. 2012;6:11–21.

Syed-Picard FN, Du Y, Lathrop KL, Mann MM, Funderburgh ML, Funderburgh JL. Dental pulp stem cells: a new cellular resource for corneal stromal regeneration. *Stem Cells Transl Med*. 2015;4(3):276-285.

Téclès O, Laurent P, Zygouritsas S, *et al*. Activation of human dental pulp progenitor/stem cells in response to odontoblast injury. *Arch. Oral Biol*. 2005;50:103-108.

Tessarz P, Kouzarides T. Histone core modifications regulating nucleosome structure and dynamics. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2014;15(11):703-708.

Tojkander S, Gateva G, Lappalainen P. Actin stress fibers--assembly, dynamics and biological roles. *J Cell Sci*. 2012;125(8):1855-1864.

Touré B, Faye B, Kane AW, Lo CM, Niang B, Boucher Y. Analysis of reasons for extraction of endodontically treated teeth: a prospective study. *J Endod*. 2011;37(11):1512-1515.

Trichet L, Le Digabel J, Hawkins RJ, *et al*. Evidence of a large-scale mechanosensing mechanism for cellular adaptation to substrate stiffness. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012;109(18):6933-6938.

Uehata M, Ishizaki T, Satoh H, *et al*. Calcium sensitization of smooth muscle mediated by a Rho-associated protein kinase in hypertension. *Nature*. 1997;389(6654):990-994.

Ullah M, Hamouda H, Stich S, Sittinger M, Ringe J. A reliable protocol for the isolation of viable, chondrogenically differentiated human mesenchymal stem cells from high-density pellet cultures. *Biores Open Access*. 2012;1(6):297-305.

- Ventola CL. The antibiotic resistance crisis: part 1: causes and threats. *Pharmacy and Therapeutics*. 2015;40(4):277-283.
- Vincent LG, Choi YS, Alonso-Latorre B, del Álamo JC, Engler AJ. Mesenchymal stem cell durotaxis depends on substrate stiffness gradient strength. *Biotechnol J*. 2013;8(4):472-484.
- Vicente-Manzanares M, Ma X, Adelstein RS, Horwitz AR. Non-muscle myosin II takes center stage in cell adhesion and migration. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2009;10(11):778-790.
- Vogel V, Sheetz M. Local force and geometry sensing regulate cell functions. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2006;7(4):265-75.
- Wada K, Itoga K, Okano T, Yonemura S, Sasaki H. Hippo pathway regulation by cell morphology and stress fibers. *Development*. 2011;138(18):3907-3914.
- Wang N, Tytell JD, Ingber DE. Mechanotransduction at a distance: mechanically coupling the extracellular matrix with the nucleus. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2009;10(1):75-82.
- Wang Y, Zhao Y, Jia W, Yang J, Ge L. Preliminary study on dental pulp stem cell-mediated pulp regeneration in canine immature permanent teeth. *J Endod*. 2013;39(2):195-201.
- Watts BR, Wittmann S, Wery M, *et al*. Histone deacetylation promotes transcriptional silencing at facultative heterochromatin. *Nucleic Acids Res*. 2018;46(11):5426-5440.
- Yamada Y, Ito K, Nakamura S, Ueda M, Nagasaka T. Promising cell-based therapy for bone regeneration using stem cells from deciduous teeth, dental pulp, and bone marrow. *Cell Transplant*. 2011;20(7):1003-1013
- Yang KL, Chen MF, Liao CH, Pang CY, Lin PY. A simple and efficient method for generating Nurr1-positive neuronal stem cells from human wisdom teeth (tNSC) and the potential of tNSC for stroke therapy. *Cytotherapy*. 2009;11(5):606-617.
- Yang J, Guo L, Liu R, Liu H. Neuroprotective effects of VEGF administration after focal cerebral ischemia/reperfusion: dose response and time window. *Neurochem Int*. 2012;60(6):592-596.
- Yang C, Tibbitt MW, Basta L, Anseth KS. Mechanical memory and dosing influence stem cell fate. *Nat Mater*. 2014;13(6):645-652.
- Yu FX, Guan KL. The Hippo pathway: regulators and regulations. *Genes Dev*. 2013;27(4):355-371.

- Zaet A, Darteville P, Daouad F, *et al.* D-Cateslytin, a new antimicrobial peptide with therapeutic potential. *Sci Rep.* 2017;7(1):15199.
- Zhang W, Walboomers XF, Shi S, Fan M, Jansen JA. Multilineage differentiation potential of stem cells derived from human dental pulp after cryopreservation. *Tissue Eng.* 2006;12(10):2813-2823.
- Zhang Q, Shi S, Liu Y, *et al.* Mesenchymal stem cells derived from human gingiva are capable of immunomodulatory functions and ameliorate inflammation-related tissue destruction in experimental colitis. *J Immunol.* 2009;183(12):7787-7798.
- Zhang LJ, Gallo RL. Antimicrobial peptides. *Curr Biol.* 2016;26(1):14-19.
- Zhao B, Ye X, Yu J, *et al.* TEAD mediates YAP-dependent gene induction and growth control. *Genes Dev.* 2008;22(14):1962-1971.
- Zhao B, Li L, Wang L, Wang CY, Yu J, Guan KL. Cell detachment activates the Hippo pathway via cytoskeleton reorganization to induce anoikis. *Genes Dev.* 2012;26(1):54-68.
- Zheng L, Zhang L, Chen L, *et al.* Static magnetic field regulates proliferation, migration, differentiation, and YAP/TAZ activation of human dental pulp stem cells. *J Tissue Eng Regen Med.* 2018;12(10):2029-2040.
- Ziskind D, Hasday M, Cohen SR, Wagner HD. Young's modulus of peritubular and intertubular human dentin by nano-indentation tests. *J Struct Biol.* 2011;174(1):23-30.

Annexe :

Liste des publications

Zaet A, Dartevelle P, Daouad F, Ehlinger C, Quilès F, Francius G, Boehler C, Bergthold C, Frisch B, Prévost G, Lavallo P, Schneider F, Haïkel Y, Metz-Boutigue MH2, Marban C. D-Cateslytin, a new antimicrobial peptide with therapeutic potential. *Sci Rep.* 2017;7(1):15199.

Dartevelle P, Ehlinger C, Zaet A, Boehler C, Rabineau, Westermann B, Strub JM, Cianferani S, Haïkel Y, Metz-Boutigue MH, Marban C. D-Cateslytin: a new antifungal agent for the treatment of oral *Candida albicans* associated infections. *Sci Rep.* 2018;8(1):9235.

Rabineau M*, Flick F* (co-premières auteures), Ehlinger C, Mathieu E, Duluc I, Jung M, Senger B, Kocgozlu L, Schaaf P, Lavallo P, Freund JN, Haikel Y, Vautier D. Chromatin de-condensation by switching substrate elasticity. *Sci Rep.* 2018,8(1):12655.

Ehlinger C, Ginies E, Bornert F, Bahi-Gross S, Schmittbuhl M, Minoux M. Decision criteria influencing the therapeutic approach to invasive cervical resorption: a case series. *Quintessence Int.* 2019;50(6):494-502.

Ehlinger C, Vautier D, Kocgozlu L. Cell signaling and strategies to modulate cell behavior. *Biomaterials for Organ and Tissue Regeneration: New Technologies and Future Prospects.* (Sous presse)

Ehlinger C, Reitzer F, Minoux M. A modified inside/outside bleaching technique for nonvital discolored teeth: a case report. *Quintessence Int.* 2019;50(10):802-807.

Ehlinger C, Dartevelle P, Zaet A, Kurashige Y, Haïkel Y, Metz-Boutigue MH, Marban C. A New Combination with D-Cateslytin to Eradicate Root Canal Pathogens. *Int J Pept Res Ther.* 2019;25 : 1679–1687.

Participation à des conférences

38èmes journées annuelles du Collège National Des Enseignants en Odontologie-Conservatrice : « Influence de la rigidité de la matrice sur la migration des cellules souches de la pulpe dentaire (communication orale) ». Ehlinger C, Rabineau M, Haikel Y, Vautier D, Kocgozlu L.

Termis Meeting 2019: Tissue Engineering Therapies: From Concept to Clinical Translation & Commercialization. Influence of matrix stiffness on the migration of DPSCs (communication orale). Ehlinger C, Rabineau M, Haikel Y, Vautier D, Kocgozlu L.

Résumé

La migration des cellules souches de la pulpe dentaire (DPSCs) est un aspect fondamental de l'ingénierie tissulaire dentaire. L'objectif de cette thèse est de déterminer l'influence de la rigidité du substrat sur la migration des DPSCs. Dans une première partie, nous avons montré que les DPSCs sont capables de survivre et de proliférer sur des substrats de polydiméthylsiloxane (PDMS) avec un module de Young de 1,5 kPa à 2,5 MPa sans se différencier. Nous avons observé que la vitesse moyenne des DPSCs est augmentée sur les substrats de faible rigidité. De plus, la Yes-associated protein (YAP) conserve une localisation nucléaire même sur les PDMS de faible rigidité. Finalement, nous avons montré que sur un substrat comportant deux rigidités différentes, les DPSCs n'adoptent pas de direction de migration préférentielle, contrairement au phénomène de durotaxie classiquement décrit dans la littérature.

Mots clés : Ingénierie tissulaire dentaire, mécanotransduction, cellules souches de la pulpe dentaire, polydiméthylsiloxane, cytosquelette, Yes-associated protein

Résumé en anglais

Migration of dental pulp stem cells (DPSCs) is a fundamental aspect of dental tissue engineering. The objective of this thesis is to investigate the influence of substrate stiffness on DPSCs migration. In the first part of this thesis, we showed that DPSCs are able to survive and proliferate on polydimethylsiloxane substrates (PDMS) with a Young's modulus of 1.5 kPa to 2.5 MPa without differentiating themselves. We observed that the average speed of DPSCs is increased on substrates with low stiffness. In addition, the Yes-associated protein (YAP) maintains a nuclear localization even on PDMS with low rigidity. Finally, we have shown that on a substrate with two different stiffnesses, DPSCs do not adopt any preferential migration direction, unlike the process of durotaxis classically described in the literature.

Keywords: Dental tissue engineering, mechanotransduction, dental pulp stem cells, polydimethylsiloxane, cytoskeleton, Yes-associated protein