La régénération d'un organe dentaire entier et fonctionnel par bio-ingénierie

Laure Marcus

▶ **To cite this version:**

Laure Marcus. La régénération d'un organe dentaire entier et fonctionnel par bio-ingénierie. Sciences du Vivant [q-bio]. 2019. hal-03298025

HAL Id: hal-03298025
https://hal.univ-lorraine.fr/hal-03298025

Submitted on 23 Jul 2021

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.

UNIVERSITÉ DE LORRAINE

AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-thesesexercice-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4
Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10
http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php
http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm

ACADÉMIE DE NANCY – METZ

UNIVERSITÉ DE LORRAINE
FACULTÉ D'ODONTOLOGIE

ANNÉE 2019 N°10787

THÈSE

pour le

DIPLÔME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN CHIRURGIE DENTAIRE

par

MARCUS Laure

Née le 15 août 1991 à Metz (57)

La régénération d'un organe dentaire entier et fonctionnel par bio-ingénierie

Présentée et soutenue publiquement le 20 septembre 2019

Examinateurs de la thèse :

Pr. P. MARTRETTE	Professeur des Universités	Président
Dr. J. GUILLET-THIBAULT	Maître de Conférences des Universités	Co-Directrice
Dr. S. CLERC	Assistant	Co-Directeur
Dr. V. MOBY	Maître de Conférences des Universités	Juge

UNIVERSITÉ DE LORRAINE | FACULTÉ D'ODONTOLOGIE DE LORRAINE

Président : Professeur Pierre MUTZENHARDT **Doyen : Professeur Jean-Marc MARTRETTE**

Vice-Doyens : Dr Céline CLEMENT – Dr Rémy BALTHAZARD – Dr Anne-Sophie VAILLANT

Membres Honoraires : Dr L. BABEL – Pr. S. DURIVAUX – Pr A. FONTAINE – Pr G. JACQUART – Pr D. ROZENCWEIG - Pr ARTIS - Pr M. VIVIER

Doyens Honoraires : Pr J. VADOT, Pr J.P. LOUIS

Professeur émérite : Pr M-P FILLEUL

Département Odontologie pédiatrique **Sous-section 56-01**	Mme	**DROZ Dominique**	Maître de Conférences *
	Mme	JAGER Stéphanie	Maître de Conférences *
	M.	PREVOST Jacques	Maître de Conférences
	Mme	HERNANDEZ Magali	Maître de Conférences Associée *
	M.	LEFAURE Quentin	Assistant
	Mme	DARSAT Claire	Assistante*
Département Orthopédie dento-faciale **Sous-section 56-01**	M.	**EGLOFF Benoît**	Maître de Conférences *
	Mme	GREGOIRE Johanne	Assistante
	Mme	LAWTON Mathilde	Assistante
Département Prévention, épidémiologie, économie de la santé, odontologie légale **Sous-section 56-02**	Mme	**CLÉMENT Céline**	Maître de Conférences *
	M.	BAUDET Alexandre	Assistant *
	Mme	NASREDDINE Greyce	Assistante
Département Parodontologie **Sous-section 57-01**	M.	**AMBROSINI Pascal**	Professeur des Universités *
	Mme	BISSON Catherine	Maître de Conférences *
	M.	JOSEPH David	Maître de Conférences *
	M.	PENAUD Jacques	Maître de Conférences
	M.	LACH Patrick	Assistant
	Mme	MAYER-COUPIN Florence	Assistante
	Mme	PAOLI Nathalie	Enseignante univ. – Praticien attachée*
Département Chirurgie orale **Sous-section 57-01**	Mme	**GUILLET-THIBAULT Julie**	Maître de Conférences *
	M.	BRAVETTI Pierre	Maître de Conférences
	Mme	PHULPIN Bérengère	Maître de Conférences *
	M.	CLERC Sébastien	Assistant*
	M.	HASNAOUI Nasr	Assistant
	Mme	KICHENBRAND Charlène	Enseignante univ. – Praticien attachée*
Département Biologie orale **Sous-section 57-01**	M.	**YASUKAWA Kazutoyo**	Maître de Conférences *
	M.	MARTRETTE Jean-Marc	Professeur des Universités *
	Mme	EGLOFF-JURAS Claire	Assistante*
Département Dentisterie restauratrice, endodontie **Sous-section 58-01**	M.	**MORTIER Éric**	Maître de Conférences *
	M.	AMORY Christophe	Maître de Conférences
	M.	BALTHAZARD Rémy	Maître de Conférences *
	M.	ENGELS-DEUTSCH Marc	Maître de Conférences
	M.	VINCENT Marin	Maître de Conférences*
	Mme	GEBHARD Cécile	Assistante
	M.	GEVREY Alexis	Assistant
	M.	GIESS Renaud	Assistant *
Département Prothèses **Sous-section 58-01**	M.	**DE MARCH Pascal**	Maître de Conférences
	M.	SCHOUVER Jacques	Maître de Conférences
	Mme	VAILLANT Anne-Sophie	Maître de Conférences *
	Mme	CORNE Pascale	Maître de Conférences Associée *
	M.	CIESLAK Steve	Assistant
	M.	HIRTZ Pierre	Assistant *
	M.	KANNENGIESSER François	Assistant
	Mme	MOEHREL Bethsabée	Assistante*
	M.	VUILLAUME Florian	Assistant
Département Fonction-dysfonction, imagerie, biomatériaux **Sous-section 58-01**	Mme	**STRAZIELLE Catherine**	Professeur des Universités *
	Mme	MOBY (STUTZMANN) Vanessa	Maître de Conférences *
	M.	SALOMON Jean-Pierre	Maître de Conférences
	Mme	WILLEMIN Anne-Sophie	Assistante Associée

Souligné : ***responsable de département*** * temps plein **Mis à jour le 08/02/2018**

A NOTRE PRESIDENT DE THESE

Monsieur le Professeur Jean-Marc MARTRETTE

Docteur en chirurgie dentaire

Doyen de la faculté d'Odontologie de Nancy

Professeur des Universités - Praticien Hospitalier

Chef de service d'Odontologie du CHU de Nancy

Docteur en Sciences Pharmacologiques

Sous-section : Sciences biologiques (Biochimie, Immunologie, Histologie, Embryologie, Génétique, Anatomie Pathologique, Bactériologie, Pharmacologie)

Vous nous avez fait l'honneur de présider ce jury.

Veuillez trouver ici l'expression de nos sincères remerciements et de notre profond respect.

A NOTRE CO-DIRECTRICE

Madame le Docteur Julie GUILLET-THIBAULT

Docteur en chirurgie-dentaire

Ancien interne

Ancien assistant hospitalo-universitaire

Praticien Hospitalier

Maître de conférences des Universités

Responsable de la sous-section : Chirurgie buccale, pathologie et thérapeutique, anesthésiologie et réanimation.

Pour avoir accepté de diriger cette thèse,

Je vous remercie de votre disponibilité et de l'intérêt que vous avez porté à mon travail.

Veuillez recevoir ici toute notre reconnaissance et l'expression de notre plus grand respect.

A NOTRE CO-DIRECTEUR

Monsieur le Docteur Sébastien CLERC

Docteur en Chirurgie Dentaire

Assistant hospitalo-universitaire

Nous vous sommes très reconnaissants d'avoir eu la gentillesse d'accepter aussi spontanément de diriger ce travail.

Un grand merci pour votre soutien, votre disponibilité et votre aide à l'élaboration de ce travail.

Veuillez trouver ici l'expression de notre gratitude.

A NOTRE JUGE

Madame le Docteur Vanessa STUTZMANN-MOBY

Docteur en Chirurgie Dentaire

Maître de Conférences des Universités – Praticien Hospitalier

Sous-section : Sciences Anatomiques et Physiologiques, Occlusodontiques, Biomatériaux, Biophysique, Radiologie.

Vous nous faites l'honneur de vous intéresser à notre travail et d'accepter de faire partie de notre jury de thèse.

Nous vous remercions pour votre enthousiasme concernant ce sujet.

Vous trouverez ici le témoignage de notre profond respect.

Sommaire

Liste des figures 10

Liste des tableaux 14

Liste des abréviations 15

Introduction 17

PARTIE I : Présentation des outils et matériaux utilisés 19

1. Les cellules souches 21

1.1 Les cellules souches embryonnaires 23

1.2 Les cellules souches péri-natales 23

1.3 Les cellules souches adultes 24

1.3.1 Les cellules souches d'origine dentaire 24

1.3.2 Les cellules souches non dentaires 33

1.3.3 Les cellules souches pluripotentes induites (iPSC) 36

1.4 Prélèvement, culture et conservation 39

1.4.1 Prélèvement 39

1.4.2 Dissociation, isolation et conservation 40

1.4.3 Législation 42

2 Interactions moléculaires 44

2.1 Facteurs de croissance 44

2.2 Réseau de gènes 45

2.3 Matrice extra-cellulaire 46

3 Biomatériaux de support tri-dimensionnel 48

3.1 Critères de choix des matériaux 48

3.2 Polymères d'origine naturelle 49

3.2.1 Matériaux utilisés 49

3.2.2 Avantages et inconvénients 52

3.3 Polymères synthétiques 53

3.3.1 Matériaux disponibles 53
3.3.2 Avantages et inconvénients 55
PARTIE II : DESCRIPTION DES TECHNIQUES D'INGENIERIE 56
1. Préalables : définitions et rappels 58
1.1 L'ingénierie tissulaire 58
1.1.1 Terminologie 58
1.1.2 Concepts 59
1.2 Rappels d'odontogenèse 61
2. Technique in vivo avec matrice tri-dimensionnelle 67
2.1 Principes 67
2.1.1 Fabrication de l'échafaudage 67
2.1.2 Implantation 73
2.1.3 Croissance et maturation 73
2.2 Expérimentations sur l'animal 74
2.2.1 Exemple de la matrice tridimensionnelle de forme dentaire 74
2.2.2 Exemple de la « dent hybride » 78
2.2.3 Exemple de la matrice cylindrique 80
3. Méthode d'agrégation cellulaire 83
3.1 Principes de mise en œuvre 84
3.1.1 Culture *in vitro* 84
3.1.2 Implantation et éruption 87
3.2 Expérimentations sur l'animal 88
3.2.1 Régénération d'une molaire par Méthode Germe d'Organe 88
3.2.2 Régénération d'une unité dentaire complète 90
3.3 Origines des quelques échecs rencontrés 93
3.3.1 Erreurs de protocole 94
3.3.2 Erreurs de manipulation 95
4. Recherche de protocoles applicables à l'Homme 97
4.1 Régénération à partir de cellules autologues 97
4.2 Régénération dentaire à partir de cellules prélevées en période post-natale 99

4.2.1 Régénération de la fraction mésenchymateuse 99
4.2.2 Régénération de la fraction épithéliale 102
4.2.3 Le cas des Cellules pluripotentes induites (iPSCs) 105
PARTIE III : Résultats, perspectives et limites 110
1 Résultats 112
1.1 Réhabilitation des caractéristiques physiologiques de la dent 112
1.1.1 Morphologie 112
1.1.3 Récupération de la fonction nerveuse 117
1.1.4 Vascularisation 122
1.1.5 Dureté et potentiel masticatoire 124
1.2 Régénération du ligament alvéolo-dentaire 125
1.2.1 Présence de ligament fonctionnel 126
1.2.2 Capacité de déplacement notamment orthodontique 127
1.3 Régénération osseuse 130
2 Perspectives et limites de l'application sur l'Homme 136
2.1 Enjeux techniques 136
2.1.1 Ajustements techniques 136
2.1.2 Adaptation du modèle à un « grand animal » 137
2.1.3 Choix des sources cellulaires adaptées 138
2.2 Faisabilité et pertinence de la technique 142
2.2.1 Développement à grande échelle, éthique et réalité financière 142
2.2.2 Efficacité des solutions alternatives déjà existantes 142
Conclusion 146
Bibliographie 148

Liste des figures

Figure 1 : Schéma simplifié des outils nécessaires à l'ingénierie tissulaire (Source : Document personnel) 20
Figure 2 : Division asymétrique des cellules souches (Source : Scheller & al, 2009)21
Figure 3 : Sources de cellules souches mésenchymateuses dentaires (Source : Sharpe, 2016)..... 25
Figure 4 : Localisation des DPSCs dans l'organe dentaire. (Source : Kamble, 2018) 26
Figure 5 : Lignées de différenciation des DPSCs (Source : Document personnel)... 27
Figure 6 : Position et histologie du ligament alvéolo-dentaire (Source : Brusselle & Dehaynin, 2018) 29
Figure 7 : Aspect radiographique du sac folliculaire entourant une prémolaire en cours de formation (Source : Consolaro, 2010)..... 30
Figure 8 : Expression des SCAPs en fonction du stade de formation radiculaire (Source : Aguilar & Lertchirakarn, 2016) 31
Figure 9 : Sources de cellules souches adultes humaines (Source : Document personnel)..... 33
Figure 10 : Reprogrammation de cellules somatiques adultes en iPSCs (Source : Antony-Debré & al, 2013) 36
Figure 11 : Accès aux cellules souches dentaires. (Wataru, 2018) 39
Figure 12 : Prélèvement du ligament alvéolo-dentaire par dissection (Source : Attias, 2017) 39
Figure 13 : Courbe de vitesse de refroidissement lors de la cryoconservation. (Source : Labbe, 2018) 41
Figure 14 : Gradient de concentration des molécules de signalisation dans l'axe antéro-postérieur (Source : Sari, 2016)..... 44
Figure 15 : Composition de la matrice extra-cellulaire (Source : Lieff, 2018) 47
Figure 16 : Exemple de matrice tridimensionnelle d'une molaire. (Source : Bécavin, 2015) 48
Figure 17 : Représentation schématique de la protéine de collagène (Source : Vigier, 2008) 49

Figure 18 : Représentation schématique du mécanisme de gélification des alginates (Source : Jouanneau, 2007) 50
Figure 19 : Production et structure chimique du chitosan (Source : Varan, 2017).... 50
Figure 20 : Formation de la structure protéique secondaire de la soie (Source : Vitz, 2016) 51
Figure 21 : Représentation schématique de la structure cristalline de l'hydroxyapatite (Source : Leroy, 2017) 51
Figure 22 : Différentes formes de Phosphates de Calcium identifiés (Source : Gras, 2014) 52
Figure 23 : Représentation schématique de la synthèse d'acide polyglycolique (Source : Belime, 2013) 53
Figure 24 : Représentation schématique de la synthèse d'Acide Polylactique (Source : Bélime, 2013) 53
Figure 25 : Structure chimique du PEEK (Source : Najeeb & al, 2015) 54
Figure 26 : Manipulation des cellules souches en bio-ingénierie dentaire (Source : Farges, 2016) 57
Figure 27 : Les diverses applications de l'ingénierie tissulaire (Source : Semino, 2013) 58
Figure 28 : Illustration des trois approches d'ingénierie tissulaire. (Source : Alsberg & al, 2001)..... 60
Figure 29 : La régénération dentaire à partir de cellules individuelles. (Source : Ikeda & Tsuji, 2008) 61
Figure 30 : Photographies comparatives des dentures humaine et murine. (Source : Jheon & al, 2013) 62
Figure 31 : Représentation schématique de la chronologie de l'odontogenèse. (Source : Sari, 2014) 62
Figure 32 : Formation de l'épithélium odontogène (Source : Nefussi, 2013) 63
Figure 33 : Stades du développement embryonnaire chez la souris (Source : Tucker & Sharpe, 2004)..... 64
Figure 34 : Aperçu d'un biomatériau créé par impression 3D pour application sur l'Homme et de l'échelle de ses pores. (Source : Montalbano, 2018)..... 68
Figure 35 : Design et fabrication d'un échafaudage dentaire de forme anatomique chez l'homme et le rat par impression 3D. (Source : Schulze & Tobiasch, 2012) 71

Figure 36 : Analyse radiographique et histologique d'implants expérimentaux et témoins récoltés et sectionnés sur 12 semaines. (Source : Dualibi & al, 2008)..... 76
Figure 37 : Ingénierie bio-radiculaire médiée par SCAPs/PDLSCs. (Source : Ikeda & Tsuji, 2008)..... 79
Figure 38 : Représentation schématique de la construction cellules/échafaudages en couches. (Source : Yang & al, 2016)..... 81
Figure 39 : Remplacement fonctionnel d'organes buccaux par la méthode du germe d'organe généré in vitro. (Source : Oshima & al, 2017)..... 83
Figure 40 : La culture par réassociations homotypiques.(Source : Document personnel)..... 84
Figure 41 : Ensemble des recombinaisons possibles par culture hétérotypique (Source : Document personnel)..... 85
Figure 42 : Eruption et occlusion d'une dent par génie tissulaire. (Source : Ikeda & al, 2009)..... 89
Figure 43 : Représentation schématique du protocole utilisé pour transplanter une unité de dent modifiée par génie tissulaire dans un modèle de perte de dent murine. (Source : Oshima & al, 2011)..... 91
Figure 44 : Génération d'une unité dentaire par ingénierie tissulaire. (Source : Oshima & al, 2011)..... 92
Figure 45 : Outils et dispositifs mis en œuvre dans les expérimentations chez la souris. (Source : Marchesan & al, 2018)..... 95
Figure 46 : Représentation schématique du protocole de Ono et al. (Source : Ono & al, 2017)..... 98
Figure 47 : Images par micro-tomographie et analyse histologique de la dent naturelle, de la transplantation de germe naturel et de la transplantation de germe par ingénierie biologique. (Source : Ono & al, 2017)..... 98
Figure 48 : Schéma récapitulatif des sources de cellules mésenchymateuses à potentiel régénératif (Source : Document personnel)..... 101
Figure 49 : Analyse MicroCT des tissus après développement. (Source : Volponi, 2013)..... 103
Figure 50 : Schéma récapitulatif des sources de cellules épithéliales à potentiel régénératif (Source : Document personnel)..... 104
Figure 51 : Réponse odontogène de cellules iPSCs indifférenciées. (Source : Otsu & al, 2014)..... 106

Figure 52 : Réponse odontogène des NCLCs dérivées de cellules iPSCs à l'épithélium dentaire. (Source : Otsu & al, 2014) 107
Figure 53 : Représentation schématique générale de la stratégie actuelle pour la régénération de la dent entière à l'aide de cellules iPSCs. (Source : Otsu & al, 2014) 108
Figure 54 : Analyse histologique d'implants expérimentaux de 12 semaines récoltés et sectionnés. (Source : Dualibi & al, 2008)..... 113
Figure 55 : Régulation de la largeur de la couronne et du nombre de cuspides de la molaire bio-générée par la méthode de manipulation cellulaire en fonction de la longueur de la zone de contact. (Source : Nakao & al, 2009) 116
Figure 56 : La coordination des fonctions buccales par les articulations temporo-mandibulaires et les muscles masticateurs est contrôlée par le système nerveux central. (Source : Oshima & Tsuji, 2015)..... 118
Figure 57 : Réponse de la douleur au stress mécanique et à la stimulation pulpaire. (Source : Ikeda & al, 2009)..... 121
Figure 58 : Évaluation de la dureté de la dent générée par ingénierie tissulaire. (Source : Ikeda & al, 2009)..... 125
Figure 59 : Mouvement expérimental des dents et réponse de la douleur au stress mécanique. (Source : Oshima & al, 2011)..... 128
Figure 60 : (**A**) Représentation schématique du mouvement orthodontique de la dent naturelle, de la dent en éruption formée par transplantation de germe naturel et de la dent bio-générée. (**B**) Photographie orale de l'appareil orthodontique conçu pour la dentition canine. (**C**) Images tomodensitométriques du mouvement dentaire de la dent en éruption formée par transplantation de germe naturel et de la dent créée par génie tissulaire avant le traitement orthodontique et après le traitement orthodontique. (Source : Ono & al, 2017)..... 129
Figure 61 : Régénération de l'os alvéolaire à la suite de la transplantation d'une unité dentaire obtenue par bio-ingénierie. (Source : Oshima & al, 2011)..... 131
Figure 62 : Modèles de bio-ingénierie dentaire. (Source : Smith & Yelick, 2016)... 136
Figure 63 : Représentation schématique de la stratégie de régénération actuelle pour le remplacement des dents/organes matures. (Source : Egusa & al, 2012)..... 141
Figure 64 : Réhabilitation prothétique d'un édentement unitaire grâce à un implant en titane immédiatement mis en fonction à l'aide d'un pilier provisoire vissé et d'une couronne en résine composite bisacryl. (Source : Bencharit & al, 2014)..... 144

Figure 65 : Autotransplantation de la dent 38 immature dans la zone de 36 édentée (Source : Sévigny & al, 2008) 144

Liste des tableaux

Tableau 1 : Tableau récapitulatif des propriétés des cellules souches dentaires (Attias, 2017 ; Huang & al, 2009) 32
Tableau 2 : Avantages et inconvénients de l'utilisation des cellules iPSCs (Malhotra, 2016) 38
Tableau 3 : Tableau récapitulatif des conditions requises au regard de la loi lors de l'utilisation des différents types de cellules souches humaines.(Source : Document personnel) 43
Tableau 4 : Tableau récapitulatif des avantages et des inconvénients des deux familles de biomatériaux (Source : Document personnel) 55
Tableau 5 : Tableau récapitulatif des résultats obtenus par quelques-unes des études de la régénération de la dent entière. (Bhanja & D'Souza, 2016) 133

Liste des abréviations

3D : Trois dimensions

ADN : Acide désoxyribonucléique

ASC : Cellule souche adipeuse

BMP : Bone Morphogenetic Protein ou Protéine morphogénétique osseuse

BMSC : Cellule souche de la moelle osseuse

CSH : Cellule souche hématopoïétique

DMSO : Dimetylsulfoxyde

DP : Doublement de population

DPSC : Cellule souche de la pulpe dentaire des dents définitives

ESC : Cellule souche embryonnaire

FGF : Fibroblast Growth Factors ou Facteur de croissance fibroblastique

HA/TCP : Hydroxyapatite/Phosphate Tricalcique

IGF : Insulin-like Growth Factors

iPSC : Cellule souche pluripotente induite

JE : Jour embryonnaire

M1 : Première molaire

MEC : Matrice extra-cellulaire

NCLC : Cellule s'apparentant aux cellules de la crête neurale

OMSC : Cellules souche d'origine gingivale

ORL : Oto-rhino-laryngologie

PAPIM : Prothèse amovible partielle à infrastructure métallique

PDGF : Platelet Derived Growth Factors

PDLSC : Cellule souche issue du ligament alvéolo-dentaire

PDSC (ou TGPC) : Cellule issue du follicule dentaire

PEEK : Polyétheréthercétone

PGA : Acide Poly-L-glycolique

PGLA : Acide poly-lactique-co-glycolique

pH : potentiel hydrogène

PLLA : Acide poly-L-lactique

PN : Post-natal

Pthr : Récepteur de l'hormone parathyroïdienne

REM : Restes épithéliaux de Malassez

RFSP : Réseau français du Sang plaquettaire

ROG : Régénération osseuse guidée

SCAP : Cellule souche de la papille apicale dentaire

SHED : Cellule souche de la pulpe des dents temporaires exfoliées

SRC : capsule rénale

TGF β : Transforming Growth Factors β ou Facteur de croissance transformant béta

Introduction

La perte dentaire ou édentement est la défaillance organique la plus répandue au monde. L'édentement total touche même plus de 158 millions de personnes.

La perte dentaire totale est synonyme pour de nombreuses espèces sauvages de sénescence précipitée. Ce phénomène suggère que la régénération dentaire spontanée n'est pas incluse phylogénétiquement dans les cellules souches post-natales des espèces. (Mao & al, 2012)

Chez l'Homme, la perte de dents peut entraîner à la fois des souffrances physiques et mentales qui compromettent l'estime de soi et la qualité de vie des individus. (Yuan & al,) Un état buccodentaire altéré est également associé à des capacités respiratoire et physique réduites ainsi qu'à un affaiblissement de certaines fonctions sensorielles qui favorisent le vieillissement de l'individu. (Naharro, 2008)

Pour restaurer la fonction occlusale ou résoudre les problèmes esthétiques de l'édentement, les solutions de réhabilitation conventionnelles qui remplacent la dent par des matériaux artificiels, sont couramment utilisées. Ces dernières décennies, les implants dentaires ostéo-intégrés, capables de restaurer la fonction occlusale sans délabrer les dents adjacentes, sont devenus la solution à privilégier.

Bien que ces thérapies artificielles aient été largement appliquées en réhabilitation dentaire, d'autres développements technologiques basés sur des découvertes biologiques sont nécessaires afin de restaurer l'intégralité des fonctions physiologiques dentaires. (Ono & al, 2017)

Le XXIème siècle sera sans doute celui de la médecine régénérative et de l'ingénierie tissulaire. Plusieurs domaines ont déjà adopté ces techniques qui sont utilisées couramment comme option thérapeutique de choix. Il est indispensable que l'odontologie profite de toutes ces avancées biotechnologiques.

Jusqu’à présent la recherche en odontologie se limitait souvent aux études des alliages, leur résistance mécanique, l’adhésion aux tissus dentaires, ou encore le pouvoir de désinfection des produits utilisés pour les traitements des affections dentaires etc... La dentisterie moderne devra très prochainement prendre conscience que son avenir est dans la biologie.

PARTIE I : Présentation des outils et matériaux utilisés en Ingénierie tissulaire

La régénération tissulaire d'un organe entier repose sur l'étude du développement embryonnaire et sur son imitation. L'objectif est de produire un bio-complexe en laboratoire en s'appuyant sur les outils présents *in vivo.*

Plusieurs méthodes ont été étudiées et les techniques de mise en œuvre diffèrent. Néanmoins trois éléments fondamentaux subsistent lorsqu'il est question d'ingénierie tissulaire, indépendamment de l'organe ciblé.

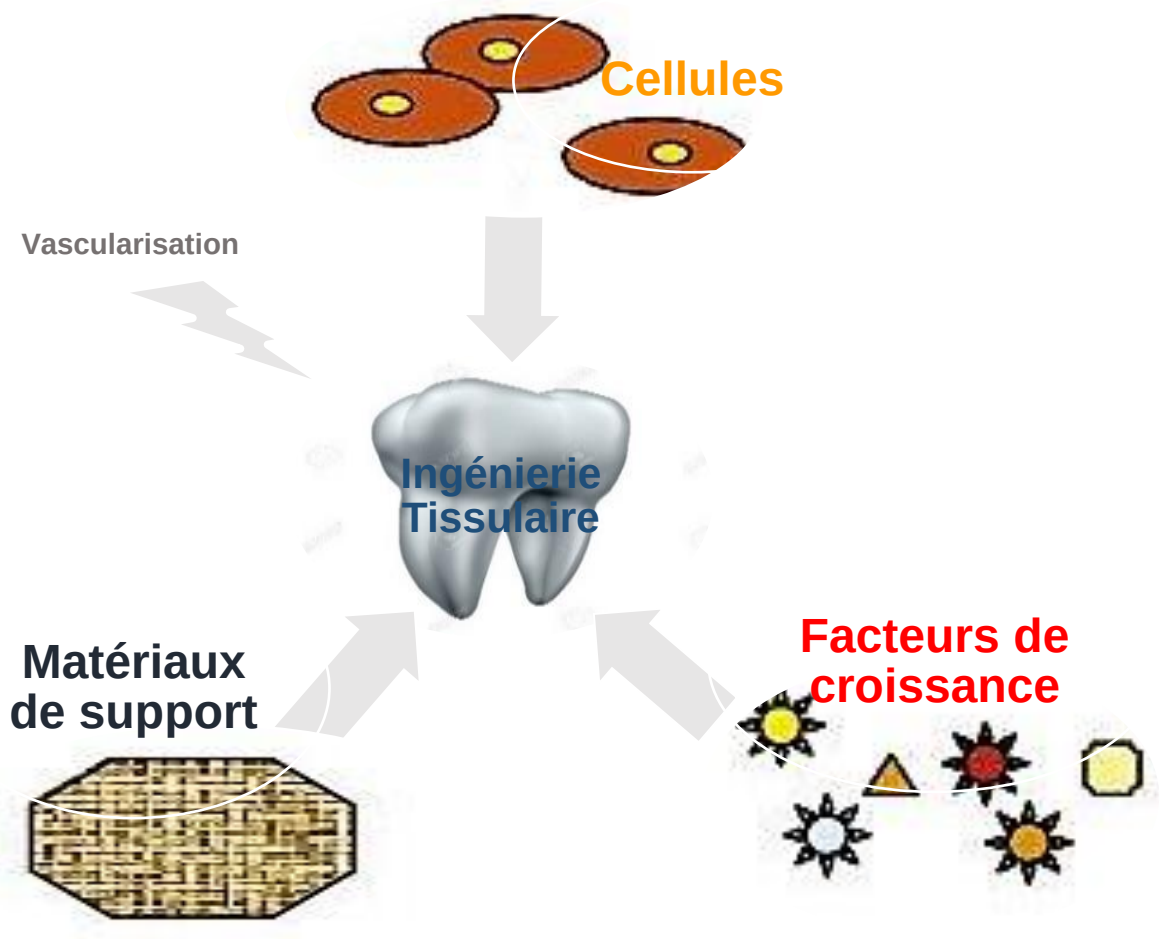

Figure 1 : Schéma simplifié des outils nécessaires à l'ingénierie tissulaire (Source : Document personnel)

Nous développerons dans cette partie la description de chacun de ces outils, leurs propriétés, et les différentes voies explorées par la recherche pour la régénération de l'organe dentaire.

1. Les cellules souches

Les cellules souches sont des cellules indifférenciées, qui ont la capacité soit de s'auto-renouveler, soit de se différencier en diverses lignées cellulaires. (Bluteau & al, 2008) (Attias, 2017)

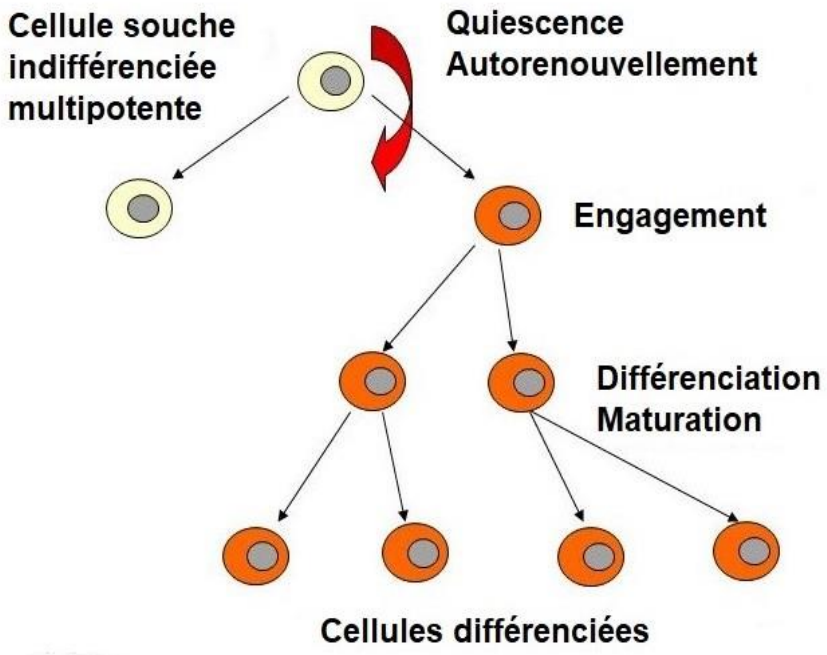

Figure 2 : Division asymétrique des cellules souches (Source : Scheller & al, 2009)

Ce processus maintient un pool de cellules régénératrices et permet une prolifération cellulaire de potentiel variable d'une population à l'autre (à noter qu'elle peut être quantifiée en nombre de doublements de population ou DP).

Il existe quatre types de cellules souches :

- les cellules souches totipotentes sont capables de générer un organisme entier en se différenciant en trois feuillets : l'ectoderme, le mésoderme et l'endoderme, ainsi qu'en annexes embryonnaires comme le placenta ;

- les cellules pluripotentes se différencient en trois feuillets embryonnaires mais sont incapables de générer les annexes et donc l'organisme entier ;

- les cellules souches multipotentes sont post-embryonnaires donc fœtales, péri-natales ou adultes et sont déjà engagées dans une voie de différenciation. Elles peuvent s'auto-renouveler et générer différentes cellules ou familles de cellules mais d'une lignée déjà déterminée ;

- les cellules souches unipotentes ne donnent naissance qu'à un type cellulaire mais restent des cellules souches puisqu'elles s'auto-renouvellent et maintiennent ainsi l'intégrité et la pérennité de la lignée. (Huang & Thesleff, 2013 ; Sari, 2014)

Ces capacités uniques ont amené les chercheurs à développer des thérapies dans le domaine de la réparation et de la régénération tissulaires.

Leurs propriétés réparatrices sont notamment étudiées en thérapie cellulaire dans le traitement des leucémies, de la maladie de Parkinson, des problèmes spinaux, de l'infarctus du myocarde, du diabète et des pathologies hépatiques.

Par ailleurs, les chercheurs en médecine régénérative sont aujourd'hui confrontés à un problème grandissant, puisque le nombre de patients sur liste d'attente d'organes croît, alors que le nombre de donneur reste stable. La finalité des recherches dans ce domaine sera donc d'accéder à la régénération d'organes entiers. (Ramier, 2012)

Ces recherches ont connu un essor dès lors qu'il est devenu possible d'obtenir des cellules pluripotentes en culture à partir de cellules différenciées : les cellules souches pluripotentes induites (iPSCs).

Les cellules souches chez l'Homme sont donc disponibles au stade embryonnaire/fœtal, péri-natal (du cordon ombilical) ou adulte.

1.1 Les cellules souches embryonnaires

Thomson & coll. furent les premiers à identifier les lignées de cellules souches embryonnaires en 1998. Celles-ci peuvent être isolées par immuno-chirurgie à partir de la masse interne de l'embryon au stade de blastocyte.

Elles incarnent la seule catégorie de cellules pluripotentes, c'est-à-dire qu'elles peuvent générer toutes les lignées de cellules somatiques (plus de 200 types cellulaires), mais pas les cellules germinales. (Kunimatsu & al, 2018)

L'utilisation de ces cellules est donc prometteuse en médecine régénérative, notamment dans le traitement des pathologies cardiaques, sanguines, hépatiques, neuronales et du diabète de type I. Elles peuvent, en effet, se différencier en cellules endothéliales, en cardiomyocytes, en hépatocytes, en progéniteurs hématopoïétiques, en neurones et en cellules pancréatiques. (Attias, 2017)

Néanmoins, dans le domaine de l'ingénierie tissulaire, ces cellules restent difficiles à obtenir et engendrent souvent des risques de cancérisation en raison de leur fort potentiel mitotique, ainsi que des problèmes de rejet par le système immunitaire de l'hôte. Leur utilisation impliquerait donc la mise en place d'un lourd traitement immunosuppresseur associé, destiné à gommer les caractéristiques génétiques du donneur. (Atala, 2005)

1.2 Les cellules souches péri-natales

Ces cellules souches présentes dans le sang du cordon, sont principalement de lignée hématopoïétique. On peut les recueillir aussi bien au niveau du placenta, qu'au niveau du cordon ombilical.

Elles font preuve d'une immaturité immunologique appréciée dans le cadre d'un projet thérapeutique puisqu'elle implique l'absence de rejet en cas de greffe. De plus, ce sang de cordon permet de fournir une source inépuisable de cellules souches autologues, facilement prélevables, et disposant d'un taux de contamination particulièrement faible.

En France, il existe un réseau public de conservation du sang placentaire (Réseau Français de Sang Placentaire ou RFSP) : on peut compter actuellement onze banques de sang placentaire. (Vishwakarma et al, 2015 ; Fagniez, 2016 ; Bourguignon, 2019)

1.3 **Les cellules souches adultes**

Les cellules souches adultes sont logées dans les organes au sein de niches périvasculaires qui les protègent de l'apoptose et de la différenciation. [*Bluteau & al, 2008*]

La plasticité des cellules souches adultes, que l'on pensait auparavant limitée, s'est avérée bien plus intéressante que prévue ; en témoigne la possibilité de générer des tissus cardiaques à partir de pulpe dentaire chez le rat.

1.3.1 Les cellules souches d'origine dentaire

- Les cellules souches épithéliales

Elles apparaissent au premier stade de l'embryogenèse et permettent la formation de l'émail par le biais d'interactions épithélio-mésenchymateuses. Ces mêmes interactions sont indispensables à la régénération de l'organe dentaire en ingénierie tissulaire.

Chez la souris adulte, elles sont présentes au niveau d'une niche située à proximité de la zone de la papille apicale des incisives à croissance continue. Néanmoins, elles n'ont pas été décelées à ce jour dans la denture humaine. (Mao & al, 2012 ; Vishwakarma et al, 2015)

- Les cellules souches mésenchymateuses

Cinq populations distinctes ont été identifiées :

- Cellules de la pulpe dentaires des dents définitives (DPSC)
- Cellules de la pulpe des dents temporaires exfoliées (SHED)

- Cellules issues du ligament alvéolo-dentaire (PDLSC)
- Cellules issues du follicule dentaire (TGPC ou PDSC)
- Cellules de la papille apicale dentaire (SCAP)

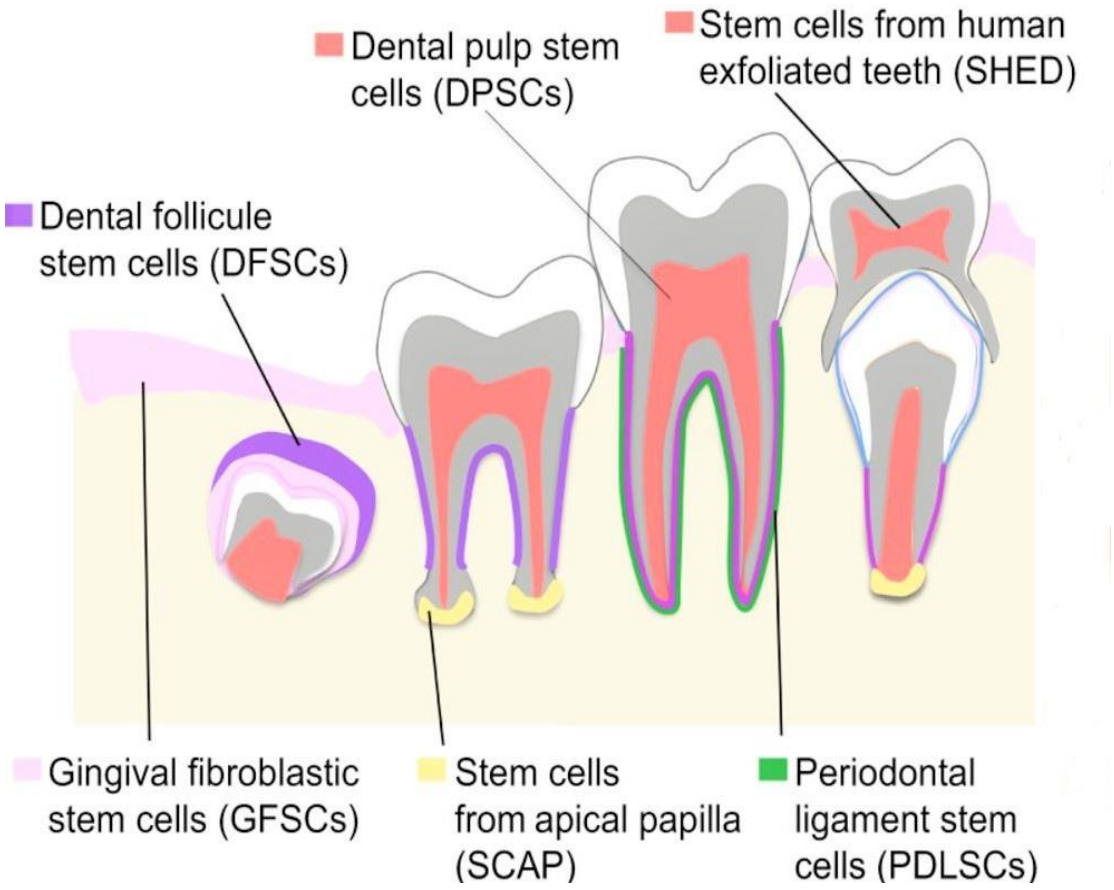

Figure 3 : Sources de cellules souches mésenchymateuses dentaires (Source : Sharpe, 2016)

- Cellules souches de la pulpe des dents définitives (DPSC)

Les cellules DPSCs (*Dental Pulp Stem Cells*) sont les premières cellules souches dentaires à avoir été identifiés par Gronthos et al. en 2000 à partir de la troisième molaire. Elles se situent au niveau de niches périvasculaires de la pulpe dentaire. (Volponi & al, 2010 ; Sedgley & Botero, 2012)

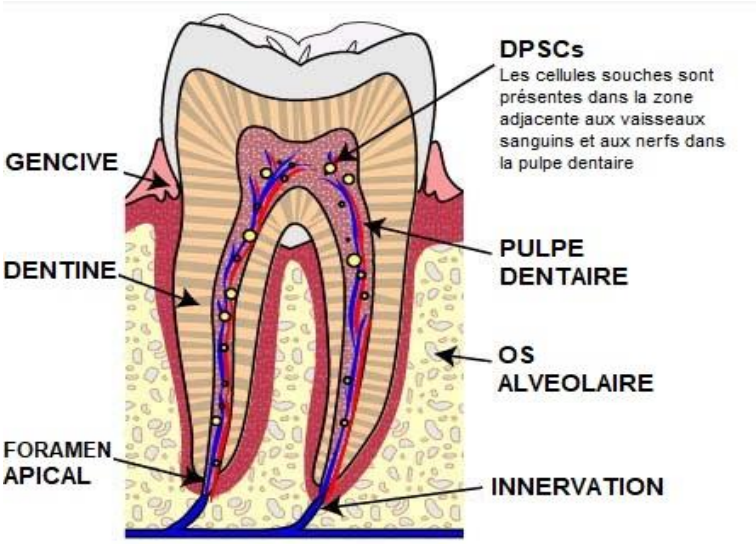

Figure 4 : Localisation des DPSCs dans l'organe dentaire (Source : Kamble, 2018)

In vivo, les DPSCs ont le potentiel de se différencier en complexes dentino-pulpaires. Dans le cas d'une dent saine, elles sont à l'état de repos. En revanche, lors d'agressions pulpaires, qu'elles soient traumatiques ou carieuses, le nombre de DPSCs augmente fortement et favorise la création de dentine réactionnelle. Ce phénomène induit la différenciation de fibroblastes en cellules « *odontoblast-like* » qui aident à la cicatrisation pulpaire. (Mao & al, 2012 ; Bécavin, 2015 ; Attias, 2017)

Une fois implantées en sous-cutané chez une souris immunodéprimée, elles donnent des tissus minéralisés de type dentine ou os. (Huang & al, 2009)

In vitro, les DPSCs peuvent se différencier en ostéoblastes, en odontoblastes, en adipocytes, en myocytes, en mélanocytes et en chondrocytes, et ont la capacité de se fixer à divers biomatériaux. (Bécavin, 2015)

Elles se révèlent donc d'excellentes candidates à de nombreuses applications médicales. On peut citer notamment le traitement et la réparation des défauts parodontaux, des tissus lésés par le diabète, des surfaces osseuses atteintes d'ostéonécrose, des zones de la peau détruites par brûlures, des tissus neuronaux, des tissus des muscles squelettiques ou des vaisseaux sanguins. (Mantesso & Sharpe, 2009 ; Hollands & al, 2018) (Figure 5)

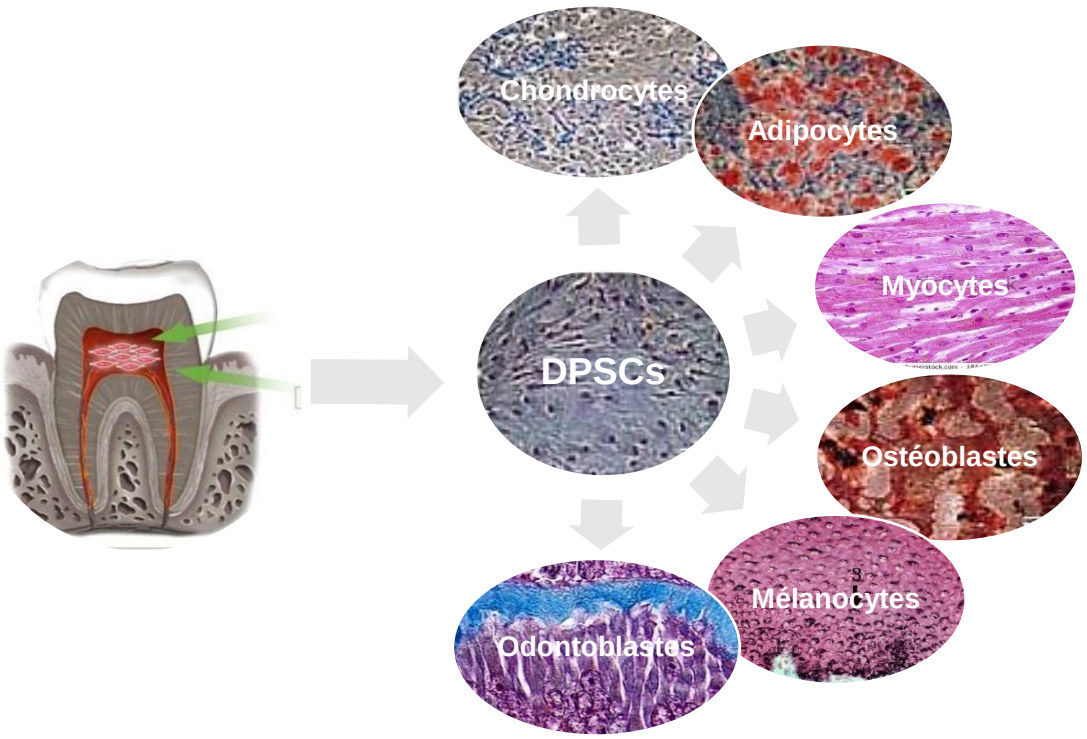

Figure 5 : Lignées de différenciation des DPSCs (Source : Document personnel)

Toutes les populations étudiées n'ont pas montré les mêmes potentiels de différenciation laissant entendre qu'il existe différentes colonies de cellules souches au sein de la pulpe avec des densités et des taux de croissance variés (qui vont de 10 à 120 doublements de population (DP) potentiels d'une colonie à l'autre). D'autre part on observe au sein d'une même colonie diverses tailles et morphologies cellulaires. (Huang & al, 2009)

De plus, il a été démontré que leurs propriétés sont en lien direct avec l'âge physique de la dent, bien que les dents permanentes, les troisièmes molaires incluses et les dents surnuméraires restent toutes d'excellentes sources de DPSCs. (Mao & al, 2012)

L'accessibilité aisée de telles cellules, couplée à leur variété de différenciation est documentée dans de nombreuses études. On peut citer notamment celle de Govindasamy et al. qui impliquait la différenciation des DPSCs en îlots similaires aux îlots pancréatiques de Langerhans pour traiter le diabète. Gandia et al., quant à eux, abordait l'éventualité d'un traitement de l'infarctus du myocarde. (Ranganathan & Lakshminarayaman, 2012)

- Cellules souches de la pulpe des dents temporaires exfoliées (SHED)

Les cellules souches de la pulpe des dents temporaires exfoliées (*Stem cells from Human Exfoliated Deciduous teeth* ou SHED) possèdent globalement les mêmes propriétés que les cellules de la pulpe dentaire adulte, en plus d'une importante capacité à régénérer de l'os *in vivo*. Elles doivent probablement cette exclusivité au fait que la résorption radiculaire entraîne une apposition osseuse lors de la rhizalyse des dents déciduales. (Bluteau & al, 2008 ; Attias, 2017)

De plus, étant admis que ces propriétés sont tributaires de l'âge de la dent, le rendement des SHEDs est à l'évidence bien supérieur à celui des DPSCs (avec un potentiel de doublement de population (DP) supérieur à 140).

Par ailleurs, ces cellules sont plus aisément accessibles compte tenu de la décidualisation naturelle des vingt dents lactéales chez l'enfant. (Nakamura & al, 2009) De plus en plus de banques commerciales sont créées dans le but de récolter les SHEDs en vue d'une utilisation autologue chez les patients adultes.

Ces deux propriétés ajoutées à leur grande plasticité et à l'expression élevée de gènes et de facteurs de croissance laisseraient penser qu'il s'agit du candidat idéal à une utilisation en ingénierie tissulaire. (Bécavin, 2015 ; Kunimatsu & al, 2018)

Toutefois, contrairement aux DPSCs, les SHEDs paraissent incapables de générer un complexe « *dentin-pulp-like* » *in vivo*. De plus, elles semblent accuser un déclin rapide de leurs facultés dans le cas d'une conservation supérieure à 2 ans. (Bécavin, 2015) A contrario, les DPSCs se conservent très bien dans le temps. Les chercheurs étudient actuellement l'éventualité d'une cryoconservation au-delà d'une décennie. (Huang & al, 2009)

- Cellules souches issues du ligament alvéolo-dentaire (PDLSC)

Le ligament alvéolo-dentaire ou ligament parodontal (PDL) est un tissu conjonctif qui permet à la surface radiculaire d'être reliée par le cément à l'os alvéolaire ; il joue le rôle d'amortisseur des forces occlusales et permet la proprioception. (Choi & al, 2013)

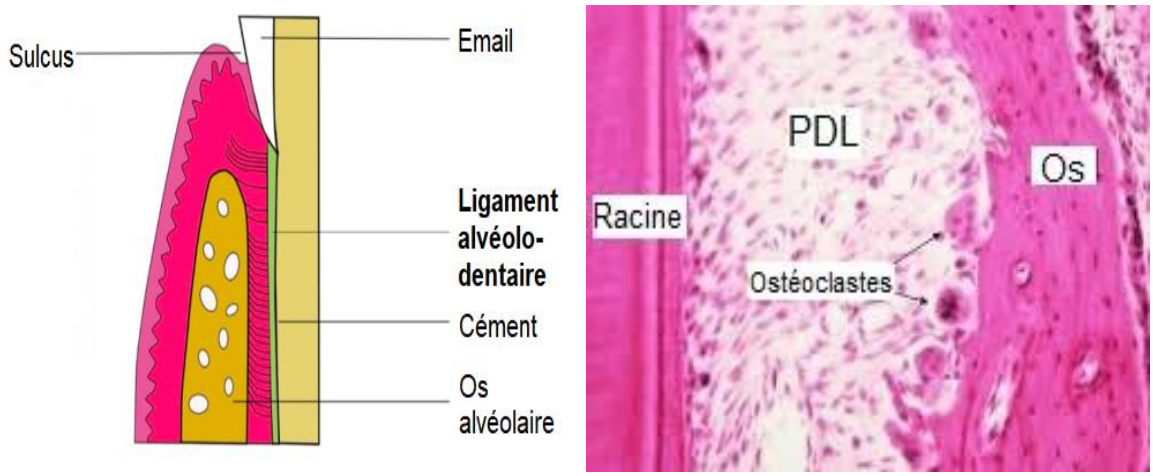

Figure 6 : Position et histologie du ligament alvéolo-dentaire (Source : Brusselle & Dehaynin, 2018)

C'est au niveau de cette zone fortement vascularisée et minéralisée qu'a été identifiée par McCulloch en 1985 puis isolée par Seo et al. en 2004 une population de cellules souches progénitrices. (Seo & al, 2004 ; Sedgley & Botero, 2012) Ces Cellules souches du ligament parodontal (*Periodontal Ligament Stem Cells* ou PDLSC) ont un potentiel de différenciation similaire aux PDSCs et BMSCs (cellules de la moelle osseuse) et peuvent engendrer *in vitro* des adipocytes, des chondrocytes (tissu conjonctif de type I), des ostéoblastes et des cémentoblastes. (Bécavin, 2015 ; Mantesso & Sharpe, 2009)

Deux facteurs peuvent agir sur ce potentiel :

- le milieu de récolte : permet par exemple de générer davantage d'os alvéolaire au niveau du tissu osseux qu'au niveau du cément et des tissus parodontaux en présence de gaine épithéliale de Hertwig ;
- l'âge du patient. (Sedgley & Botero, 2012)

Les PDLSCs sont facilement isolables après extraction dentaire et elles gardent leur potentiel de différenciation après cryoconservation. En outre, de récentes expériences ont montré leur capacité à régénérer des tissus parodontaux comme le cément, l'os alvéolaire, ainsi que le ligament alvéolo-dentaire une fois transplanté chez des souris immunodéprimées. Elles pourraient donc aisément être utilisées dans de futures applications thérapeutiques. (McCulloch, 1985 ; Huang & al, 2009)

- Cellules souches issues du follicule dentaire (PDSC ou TFPC)

Le follicule dentaire est un tissu conjonctif lâche et vascularisé qui, par le biais du sac folliculaire, contient le germe dentaire en formation. (Figure 7)

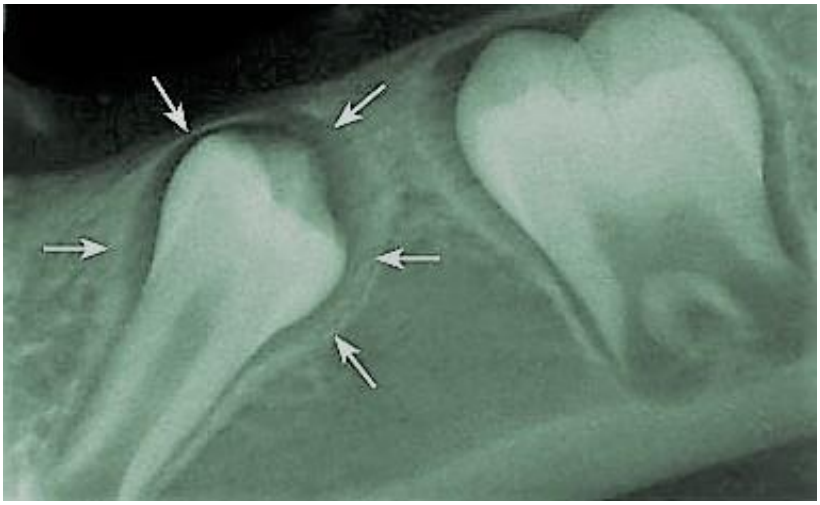

Figure 7 : Aspect radiographique du sac folliculaire entourant une prémolaire en cours de formation (Source : Consolaro, 2010)

On y trouve également des cellules souches ou progénitrices appelées Cellules issues du follicule dentaire (PDSC ou *Dental Follicle Precursor Cells*), isolées pour la première fois au niveau de germes de la troisième molaire. Elles peuvent se différencier en ostéoblastes, cémentoblastes, adipocytes et chondrocytes.

Les PDSCs sont dotées d'une grande plasticité, elles ont une capacité de différenciation infinie et peuvent générer chez l'animal immunodéprimé du cément, de l'os et des fibres qui s'apparenteraient au ligament alvéolo-dentaire ; *in vitro* on obtiendrait même des odontoblastes. (Attias, 2017)

Cependant, le potentiel de développement des tissus durs des PDSCs est plus faible que celui des DPSCs, car leur taux de calcium est inférieur lors du développement embryonnaire. Les DPSCs seraient donc plutôt vouées à une différenciation odontoblastique et les PDSCs à une différenciation cémentoblastique. (Sari, 2014)

- Les cellules souches de la papille apicale dentaire (SCAP)

Une population de cellules souches mésenchymateuses a été identifiée au niveau du tissu papillaire situé à la jonction entre la pulpe et l'apex de la racine des dents en développement : la papille apicale. (Figure 8) Celle -ci joue un grand rôle dans le développement radiculaire. Ces cellules ont été isolées pour la première fois sur les troisièmes molaires et sont appelées Cellules souches de la papille apicale dentaire (*Stem Cells of the Apical Papilla* ou SCAP) (Mantesso & Sharpe, 2009).

Figure 8 : Expression des SCAPs en fonction du stade de formation radiculaire (Source : Aguilar & Lertchirakarn, 2016)

Les SCAPs présentent de grandes similarités avec les DPSCs et les SHEDs *in vivo* ainsi que dans leur différenciation *in vitro*. On peut distinguer la pulpe dentaire de la papille apicale car cette dernière génère des précurseurs de la pulpe radiculaire. (Huang & al, 2009)

Elles peuvent générer des lignées odontoblastiques, ostéogéniques, neurogéniques et adipogéniques, chondrocytaires, etc.

Elles sont idéalement prélevables au niveau des dents de sagesse en développement, elles présentent un taux de prolifération 2 à 3 fois supérieur aux cellules de la pulpe et semblent prometteuses pour régénérer la racine dentaire (*Attias, 2017*). Elles sont

également utilisées dans le domaine de la régénération endodontique et de la revascularisation des dents immatures. (Bécavin, 2015 ; Marx, 2015)

Tableau 1 : Tableau récapitulatif des propriétés des cellules souches dentaires (Source : Document personnel)

	DPSCs	SHEDs	PDLSCs	DFSCs	SCAPs
Localisation	Pulpe de la dent permanente	Pulpe des dents temporaires	Ligament alvéolo-dentaire	Follicule dentaire des dents en cours d'éruption	Papille apicale des dents immatures
Taux de prolifération	Modéré	Elevé	Elevé	Elevé	Elevé
Hétérogénicité	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui
Potentialité	- Odontoblastique - Ostéoblastique - Myocytaire - Chondrocytaire - Neurocytaire - Adipocytaire - Epithéliales de la cornée - Mélanocytaire - iPSC	- Odontoblastique - Ostéoblastique - Myocytaire - Chondrocytaire - Neurocytaire - Adipocytaire - iPSC	- Odontoblastique - Ostéoblastique - Chondrocytaire - Neurocytaire - Cémentoblastique	- Odontoblastique - Ostéoblastique - Neurocytaire	- Odontoblastique - Ostéoblastique - Neurocytaire - Adipocytaire - iPSC
Tissus régénérés ou réparés	- Os - Neurones - Muscles - Dentine pulpaire	- Os - Neurones - Muscles - Dentine	- Os - Racines - Cément - Parodonte - Ligament alvéolo-dentaire	- Os - Cément - Parodonte	- Os - Neurones - Racines - Dentine pulpaire

1.3.2 Les cellules souches non dentaires

En dehors des tissus dentaires, les cellules souches sont présentes dans divers tissus du corps humain tels que la moelle osseuse, les vaisseaux sanguins, le cerveau, le foie, le pancréas, la rétine, la peau, le sang, les muscles et les tissus adipeux. Nous aborderons le cas des cellules qui semblent les plus prometteuses dans notre domaine.

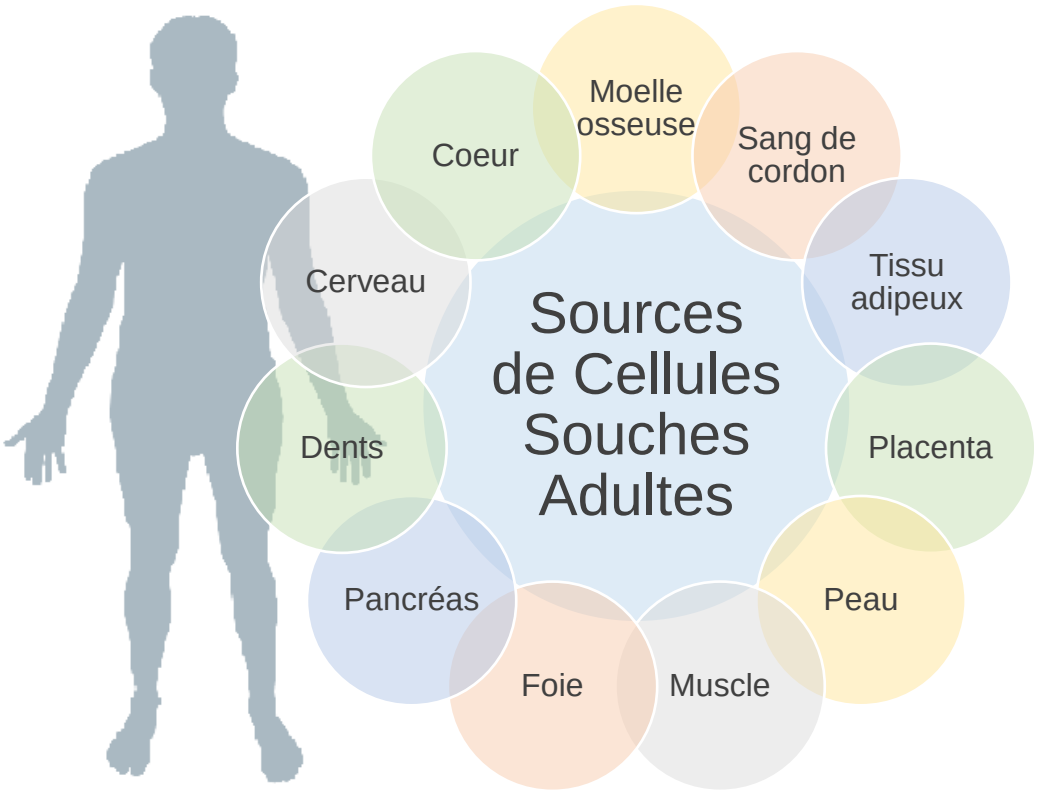

Figure 9 : Sources de cellules souches adultes humaines (Source : Document personnel)

- Les cellules souches d'origine gingivale (OMSC)

La muqueuse buccale est composée d'une fraction épithéliale (épithélium pavimenteux), d'une membrane basale et d'une composante conjonctive. Au niveau de la gencive attachée, la lamina propria située dans la partie conjonctive concentre une population de cellules souches mésenchymateuses appelées Cellules souches de la muqueuse orale (*Oral Mucosa Stem Cells* ou OMSC). (Wataru, 2018)

Zhang et al. en 2009 qui furent les premiers à identifier ces cellules et Marynka et coll. en démontrèrent le fort potentiel ubiquitaire. Elles peuvent se différencier en lignées osseuses, cartilagineuses, adipeuses et neuronales.

Leur facilité d'isolement, leur abondance, leur multipotence, leur expansion rapide *ex vivo* et leur potentiel anti-inflammatoire en font des candidats de choix pour l'ingénierie tissulaire même si elles ont été peu étudiées jusqu'à présent. (Mao & al, 2012 ; Sari, 2014)

- Les cellules souches de la moelle osseuse (BMSC)

La moelle osseuse a la particularité de présenter la principale lignée de cellules souches hématopoïétiques identifiée en 1963, mais le stroma de celle-ci est également la source de cellules souches mésenchymateuses multipotentes. (Renard, 2005) Elle contient donc une petite population de cellules progénitrices capables de se différencier en lignées ostéogéniques, chondrogéniques, adipogéniques, myogéniques et neurogéniques.

Malgré leur faible nombre, ces cellules sont très hétérogènes, elles possèdent un pouvoir clonogénique intéressant, une grande plasticité, un fort taux de prolifération et adhèrent facilement au milieu de culture (Renard, 2005 ; Huang & al, 2009). Cependant leur potentiel de croissance est limité à 30-50 doublements de population (contre 70 en moyenne pour les DPSCs par exemple). (Huang & al, 2009)

Ces cellules seraient capables de générer des facteurs de croissance et des morphoprotéines très utiles dans le développement dentaire. De plus, on a observé la présence de nombreux marqueurs de surfaces similaires à ceux des cellules dentaires.

Par ailleurs on peut obtenir des odontoblastes et des améloblastes fonctionnels dans des milieux de cultures adaptés (en présence de cellules épithéliales et mésenchymateuses dentaires). Elles sont néanmoins incapables d'engendrer une morphologie coronaire satisfaisante. (Cavazzana-Calvo & al, 2004 ; Maria & al, 2007)

- Cellules souches des glandes salivaires

Ces cellules, identifiées chez le rat par Kishi et al., ont un fort potentiel de prolifération, mais une capacité de différenciations limitée aux lignées acineuses, canalaires et épithéliales.

Leur éventuelle utilisation reste donc limitée pour l'instant aux patients souffrant de xérostomie et elle présente notamment un avenir prometteur dans le traitement des patients irradiés au niveau de la sphère ORL. (Scheller & al, 2009 ; Sari, 2014 ; Attias, 2017 ; Wataru, 2018)

- Cellules souches du périoste

Ces cellules sont situées au niveau de la surface externe des os, elles ont été identifiées dès 1932 et sont capables de se différencier en ostéoblastes, en adipocytes et en chondrocytes.

En ingénierie tissulaire, elles sont pour l'instant utilisées dans la régénération osseuse notamment par les chirurgiens-dentistes pour augmenter le volume d'os alvéolaire. (Wright & al, 2002 ; Attias, 2017 ; Wataru, 2018)

- Les cellules souches adipeuses (ASC)

Le tissu adipeux est particulièrement abondant, et les cellules y possèdent un maintien de leur potentiel de différenciation avec l'âge. Elles sont notamment prélevables par liposuccion ou lipectomie. Le corps adipeux de la joue constitue un exemple de source d'ASCs dans la sphère orale. (Attias, 2017)

Il représente une importante source de cellules souches mésenchymateuses, dont le fort potentiel ostéogénique est très apprécié dans les recherches pour la régénération osseuse.

En chirurgie orale, une fois associées à un substitut osseux de type Bio-oss®, les ASCs sont utiles dans le cadre de greffes autologues pour la régénération osseuse ou

l'ostéointégration mais également pour l'induction de la régénération de la pulpe canalaire. (Wright & al, 2002 ; Sari, 2014)

1.3.3 Les cellules souches pluripotentes induites (iPSC)

En 2006, Takahashi et Yamanaka ont découvert un moyen de reprogrammer des cellules somatiques adultes afin de leur rendre leur potentiel pluripotent.

Les iPSCs (ou *induced Pluripotent Stem Cells*) sont des cellules souches pluripotentes obtenues artificiellement par manipulation génétique de cellules somatiques. Le protocole consiste à introduire à l'aide d'un rétrovirus les gênes nécessaires à la dédifférenciation cellulaire.

Les cellules iPSCs peuvent donc être obtenues à partir de cellules progénitrices (SCAPs, DPSCs, SHEDs, …etc.) ou somatiques (fibroblastes de la muqueuse orale, fibroblastes gingivaux, fibroblastes du ligament périodontal) par transduction rétrovirale de quatre facteurs de transcription : Oct4, Sox2, Klf4 et c-Myc. (Otsu, 2014 ; Malhotra, 2016) (Figure 10)

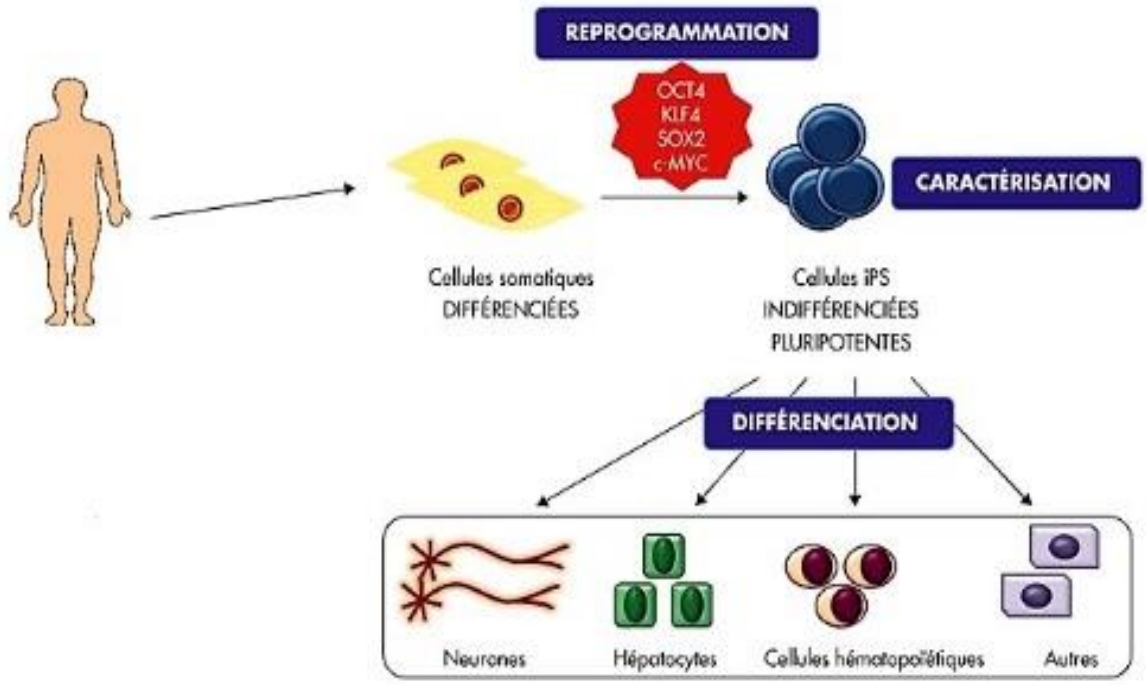

Figure 10 : Reprogrammation de cellules somatiques adultes en iPSCs (Source : Antony-Debré & al, 2013)

Actuellement, des techniques non intégrantes, à savoir sans virus et sans ADN, ont été développées pour la production de cellules iPSCs.

Il s'agit de techniques dites « de la goutte pendante », qui impliquent l'emploi de vecteurs protéiques. Cette méthode de culture s'oppose à la culture en monocouches, et reproduit plus fidèlement l'architecture directe d'adhésion cellule-cellule.

Il s'agit d'une méthode simple dans laquelle les cellules sont placées dans une culture en goutte suspendue. Elles sont incubées dans des conditions physiologiques jusqu'à ce qu'elles forment de vrais sphéroïdes dans lesquels les cellules sont en contact direct les unes avec les autres et avec des composants de la matrice extracellulaire. L'adjonction de vecteurs protéiques permet de générer le potentiel pluripotent des cellules cultivées. (Foty, 2011 ; Otsu, 2014 ; Malhotra, 2016)

Les cellules iPSCs présentent de nombreux intérêts :

- Elles peuvent être générées à partir de cellules totalement différenciées et possèdent une pluripotence similaire à celle des cellules souches embryonnaires (ESCs). (Bei, 2009 ; Otsu, 2014) Elles ont donc un potentiel de prolifération élevé et se différencient en tous les dérivés des trois couches germinales primaires (ectoderme, endoderme et mésoderme) et en de nombreuses cellules matures *in vitro*.

  Hiyama et al. ont observé des réponses similaires de cellules de type odontoblaste dérivées d'iPSCs et de cellules dérivées de cellules ESCs. Les cellules iPSCs sont également capables de se différencier en ostéoblastes matures et produisent une hydroxyapatite ayant une structure cristalline similaire à celle de l'hydroxyapatite associée aux cellules souches mésenchymateuses.
- D'autre part, puisqu'elles dérivent des cellules autologues du patient, elles sont biocompatibles et peuvent aider à la modélisation de la maladie, au dépistage et à la conception de traitements adaptés à chaque patient. (Yamanaka, 2012)

Cette approche innovante facilite l'emploi de la médecine régénérative sur l'Homme puisque les iPSCs permettent de se substituer aux cellules souches embryonnaires et donc de s'affranchir des problèmes pratiques et éthiques que celles-ci impliquent. (Takahashi & al, 2007)

Les iPSCs présentent cependant un inconvénient de taille. Elles sont sujettes à une forte instabilité génomique et ont une propension au développement de masses tumorales *in vivo*. Il a également été démontré que les iPSCs gardent une mémoire épigénétique de leur cellule d'origine et se différencieront préférentiellement vers la lignée en question. (Cai & al, 2013 ; Huang & Thesleff, 2013)

Tableau 2 : Avantages et inconvénients de l'utilisation des cellules iPSCs (Source : Malhotra, 2016)

Avantages	Inconvénients
- Universellement accessibles, relativement faciles à obtenir et à traiter - Potentiel de prolifération et de différenciation en tous les dérivés des 3 couches germinales primaires : l'ectoderme, l'endoderme et le mésoderme - Potentiel de production des cellules spécifiques à un patient ou à une maladie de n'importe quelle lignée à des fins thérapeutiques - Fournissent un réservoir illimité de cellules souches sans controverse éthique des matériaux embryonnaires - Accessibles de manière autogène : pas de problèmes éthiques et immunologiques liés aux cellules souches embryonnaires. Moins de risque de rejet immunitaire et biocompatibilité. - Production des iPSCs facilement amplifiable : source illimitée de cellules pour des applications cliniques	- Conservation d'une mémoire épigénétique de leur phénotype précédent : potentiel de différenciation limité et apparition de différence de reprogrammation entre les différentes lignées. - Risque de prolifération incontrôlable des cellules iPSCs non différenciées résiduelles : apparition de tératomes - Pluripotence de nature artificielle : risques encourus ? - Risque intrinsèque de transformation cellulaire dû au virus intégrant le génome. : transfection d'oncogènes dans les cellules ?

1.4 **Prélèvement, culture et conservation**

1.4.1 Prélèvement

La technique de prélèvement dépend du type cellulaire. Les cellules de la moelle osseuses seront prélevées par aspiration/ponction de la moelle osseuse. Les cellules souches sanguines sont obtenues par prélèvement de fluides. Quant aux cellules souches des tissus adipeux, aux cellules d'origine dentaire, etc., elles sont atteintes par prélèvement tissulaire. (Figures 11 & 12)

Le prélèvement de cellules d'origine dentaire est relativement aisé : à partir de dents déciduales avulsées pour les SHEDs, ou même permanentes pour les PDLSCs, les DPSCs, et plus spécifiquement à partir des germes des troisièmes molaires pour les SCAPs et les PDSCs. (Volponi & al, 2010 ; Yeasmin & al, 2014)

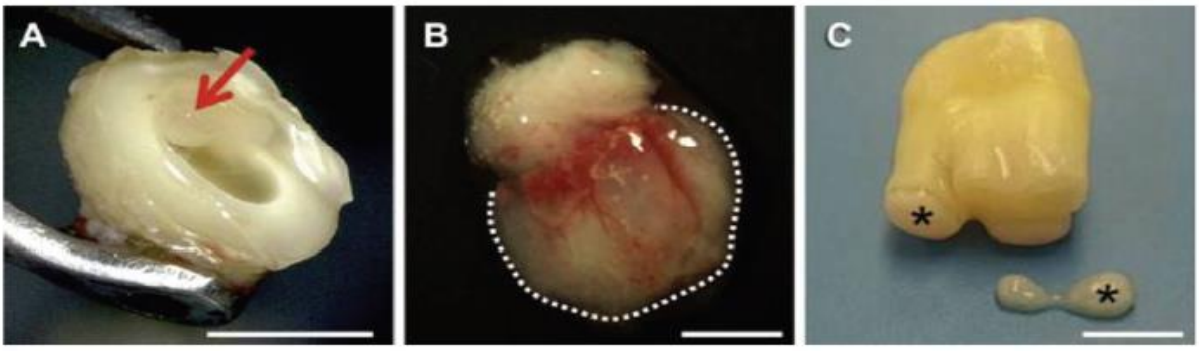

Figure 11 : Accès aux cellules souches dentaires. (A) : les DPSCs au niveau de la pulpe dentaire. (B) : les DFPCs au niveau du sac folliculaire d'une troisième molaire. (C) : SCAPs au niveau de la papille apicale d'une troisième molaire extraite. (Wataru, 2018)

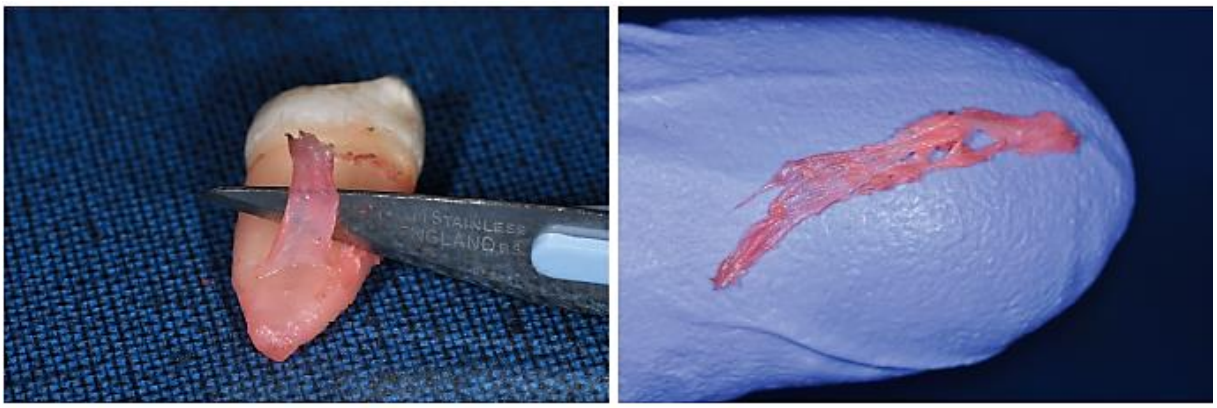

Figure 12 : Prélèvement du ligament alvéolo-dentaire par dissection (Source : Attias, 2017)

1.4.2 Dissociation, isolation et conservation

- Dissociation

Après prélèvement, les cellules souches doivent être isolées de la matrice extra-cellulaire.

Ceci est rendu possible grâce à une dissociation enzymatique dans un milieu enrichi en enzymes telles que la collagénase, la DNase ou la dispase. Cette procédure peut être associée ou non, à une dissociation mécanique des fragments (agitation, centrifugation, broyage, etc…). (Choi & al, 2013)

Une fois dissociées, elles seront ensemencées dans un milieu de culture.

- Culture

Actuellement, il n'existe pas de technique de culture standardisée des cellules souches. Celle-ci dépend du type cellulaire, du sujet sur lequel elles ont été prélevées et de l'objectif à atteindre. La culture peut être manuelle ou automatisée.

La culture se fait généralement dans une atmosphère humide à 37°C à 5% de CO_2. Le milieu est supplémenté en antifongiques et en antibiotiques (pénicilline, streptomycine, amphothéricyne B). (Batouli & al, 2003 ; Renard, 2005 ; Kunimatsu, 2018) Contrairement à la culture des cellules somatiques classique, les cellules souches mésenchymateuses présentent un plus grand nombre de colonies et prolifèrent plus rapidement dans un milieu hypoxique que dans un milieu normoxique. (Dualibi & al, 2004 ; Vishwakarma et al, 2015)

- Conservation

L'avenir thérapeutique des cellules souches est moindre si on ne met pas au point un moyen pérenne et efficace de les préserver. Il n'existe pas de méthode universelle de conservation des cellules souches.

Les cellules sont préservées et stockées au long terme par cryoconservation selon le protocole suivant :

- le traitement pré-gel : on place les échantillons en présence d'une solution alcoolique (mannitol, sorbitol) qui provoquera une légère déshydratation qui permet d'éviter un choc osmotique trop important lorsqu'elles seront plongées dans une solution de cryoprotection. On doit également procéder à une pré-réfrigération à +4°C qui permet d'éviter les chocs thermiques ;
- l'introduction d'une solution de cryoconservation : elle garantit une cryoprotection des cellules une fois associée à une congélation lente. La plupart du temps on utilise le glycérol ou le Dimetylsulfoxyde (DMSO) à une concentration de 10%. Ces solutions sont idéales pour se substituer à une partie de l'eau intracellulaire, elles permettent ainsi une déshydratation partielle des cellules et limitent la formation de cristaux de glace intracellulaires. Ce sont ces cristaux qui sont à l'origine de déchirures de la membrane cellulaire lors de la décongélation des cellules, ce qui entraîne la mort de celles-ci ; (Ryan, 2004 ; Guignot, 2005)
- le protocole de congélation : celle-ci doit être plutôt lente et non agressive mais assez rapide pour éviter l'altération des cellules. Ceci est possible grâce à une vitesse de refroidissement étudiée et standardisée (Figure 13) ;

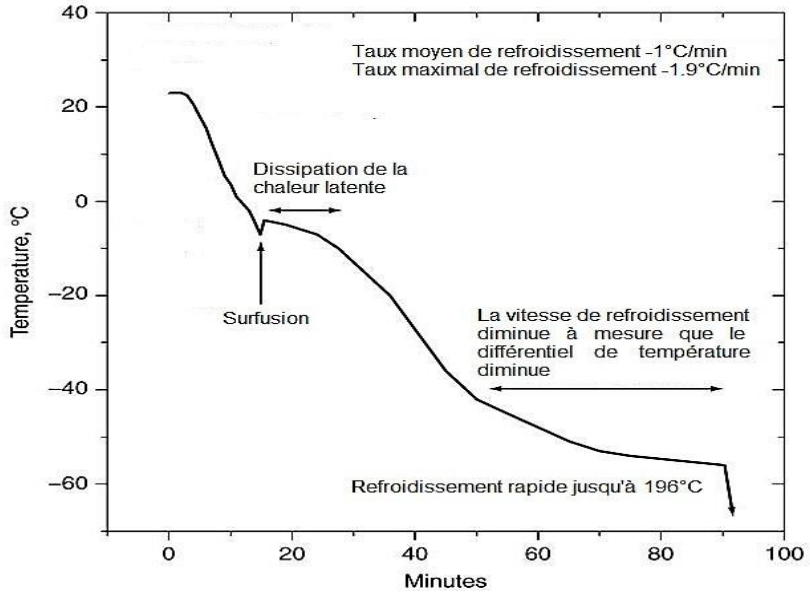

Figure 13 : Courbe de vitesse de refroidissement lors de la cryoconservation. La dissipation de la chaleur latente permet à l'échantillon de reprendre sa baisse de

température. La surfusion correspond à l'état de l'échantillon qui demeure liquide au-delà de son seuil de solidification. (Source : Labbe, 2018)

- le stockage : les cellules sont placées dans des récipients spéciaux appelés tubes cryogènes/aliquots qui conservent de bonnes propriétés mécaniques à des températures critiques. Ceux-ci seront ensuite étiquetés, archivés, puis stockés et conservés dans des congélateurs ou conteneurs d'azote capables de maintenir une température constante située dans une fourchette de -130°C à -196°C. (Ryan, 2004 ; Munévar & al, 2015)

La manipulation des cellules souches est très délicate et les opérateurs doivent être formés afin d'éviter au maximum de les endommager au cours des différentes étapes du protocole. (Pedeutour, 2009) De plus, on observe une accélération de la senescence cellulaire lors de congélation et décongélation successives.

En effet, ces manipulations peuvent modifier les propriétés chimiques et physiques des produits. Elles peuvent également stresser les protéines, dénaturer de manière irréversible la structure macromoléculaire complexe et conduire à une accélération de la sénescence cellulaire. (Puri & al, 2015)

1.4.3 Législation

L'utilisation de CSEs humaines requiert inévitablement la destruction d'un embryon humain. Un dilemme éthique qui nécessite un encadrement soumis à une réglementation stricte. A ce sujet, la loi de bioéthique du 6 août 2004 en France a été révisée et assouplie en juillet 2011 pour favoriser la recherche médicale. (Fagniez, 2016)

Cette loi permet à présent aux équipes de recherches d'obtenir des dérogations afin d'utiliser les CSEs sous plusieurs conditions :

- les recherches vont permettre des progrès médicaux majeurs ;

- ces progrès sont impossibles par le biais d'une recherche n'utilisant pas les CSEs ;

- le projet est pertinent et sa mise en œuvre est éthiquement intéressante.

D’autre part, ces recherches ne seront menées qu’à partir d’embryons surnuméraires créés *in vitro* lors d’une assistance médicale à la procréation avec consentement du couple.

A l’étranger, certains pays comme le Royaume-Uni, la Belgique, Singapour, l’Espagne ou les Etats-Unis possèdent une législation plus souple. Elle autorise la plupart des techniques sur l’embryon à l’exception du clonage reproductif.

La même loi prévoit que le prélèvement de CSHs de la moelle osseuse par ponction ou par cytaphérèse doit nécessiter le recueil du consentement du donneur. Quant aux cellules souches placentaires, actuellement seule l’utilisation allogénique est autorisée à visée thérapeutique.

L’utilisation de cellules souches adultes soulève moins de questions de bioéthique que celle des ESCs, elle est cependant bien règlementée et doit être justifiée par sa pertinence et sa nécessité au progrès médical. (Casabona & Maria, 2006 ; Reppel & al, 2012 ; Fagniez, 2016)

Tableau 3 : Tableau récapitulatif des conditions requises au regard de la loi lors de l’utilisation des différents types de cellules souches humaines. Source : Document personnel)

Type cellulaire	Conditions requises
Cellules souches embryonnaires	- A partir d’embryons surnuméraires obtenus *in vitro* uniquement - Progrès majeurs permis - Non substituables - Projet pertinent et éthique
Cellules souches péri-natales	- Utilisation allogénique uniquement
Cellules souches adultes : - Cellules souches hématopoïétiques (Moelle osseuse) - Cellules souches mésenchymateuses	- Volontaire et consentement éclairé - Pertinence - Progrès médicaux permis

2 Interactions moléculaires

2.1 Facteurs de croissance

- Facteurs utilisés

Les facteurs de croissance sont utilisés pour stimuler la prolifération et la différenciation cellulaire. Afin de déterminer, les facteurs importants, les chercheurs ont étudié le développement embryologique de l'organe dentaire dans le but d'en identifier les acteurs et d'en reproduire le mécanisme.

Les facteurs mis en œuvre sont les suivants :

- Transforming Growth Factors β (TGF β)
- Bone Morphogenetic Protein (BMP)
- Fibroblast Growth Factors (FGF)
- Insulin-like Growth Factors (IGF)
- Platelet Derived Growth Factors (PDGF)

Les facteurs jouent un rôle important à la fois dans le développement dentaire, dans la détermination de la nature morphologique et la position de la dent en fonction de leur gradient de concentration. (Mantesso & Sharpe, 2009 ; Egusa & al, 2012)

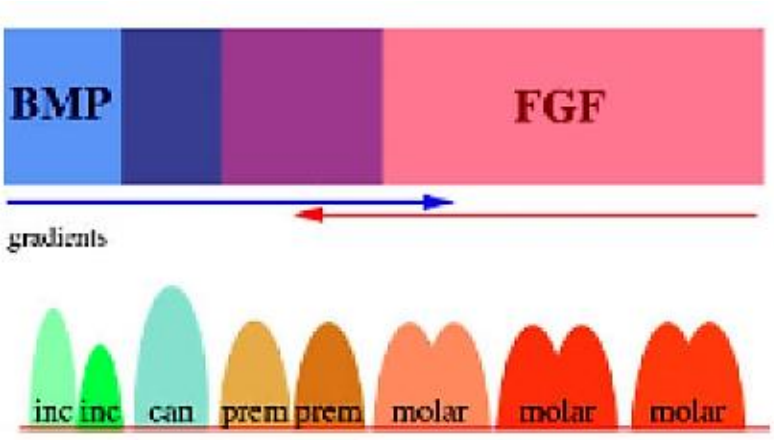

Figure 14 : Gradient de concentration des molécules de signalisation dans l'axe antéro-postérieur (Source : Sari, 2016)

- Mode d’administration et système de libération

Ces deux facteurs ainsi que leur dose optimale sont à étudier en détails avant d’utiliser ces protéines.

Les facteurs de croissance sont très rapidement éliminés par l’organisme, il est donc nécessaire d’optimiser leur délivrance au niveau local.

Pour cela, une coordination spatiale avisée est requise pour maintenir un équilibre dynamique entre la vitesse de diffusion du signal le long du gradient de concentration et leur élimination par le métabolisme. Cette administration est possible soit par des dispositifs de libération spécifiques, soit grâce aux cellules co-transplantées. (Vishwakarma et al,2015)

- Règlementation

L’utilisation des facteurs de croissance sur l’Homme en médecine est très réglementée.

Une enquête peut être nécessaire pour déterminer la qualité scientifique de l’investigation clinique.

De plus, l’étude basée sur les facteurs de croissance n’est autorisée que si le protocole en justifie pleinement l’emploi. (Chapekar & Gunter, 1992)

2.2 **Réseau de gènes**

L’odontogenèse est étudiée afin d’identifier les gènes responsables de la génération de l’organe dentaire.

Ces gènes sont notamment impliqués dans la détermination de l’identité de la dent et de la région odontogénique. (Vishwakarma et al, 2015)

Parmi eux, on peut citer BMP, FGF, Shh, et Wnt pour le développement dentaire (Inanç

& Elçin, 2011), ainsi que Msx, Dlx et Barx pour la détermination de la morphologie. (Bei, 2009 ; Vishwakarma et al, 2015)

Ainsi, Msx-1 et -2 jouent un rôle déterminant dans l'histomorphogenèse et la cytodifférenciation. On a démontré qu'une mutation de Msx-1 entraînait une agénésie bilatérale des deuxièmes prémolaires et des deuxièmes molaires.

Dans la famille des gènes Dlx, on retrouve notamment Dlx-1 et Dlx-2 dont l'action s'exprime dans les germes des molaires supérieures. Ils ont une action redondante, puisque l'inactivation de l'un des deux gènes n'entraîne pas d'agénésie de ces molaires (contrairement à l'inactivation simultanée des deux). (Tucker & Sharpe, 2004)

Quant à la famille Barx, elle comporte deux gènes Barx-1 et -2 qui s'expriment dans les processus maxillaires et mandibulaires. En revanche, Barx-1 ne s'exprime pas dans la région des germes incisifs. (Ohazama & al, 2004 ; Hu & al, 2006 ; Sari, 2014)

Les conséquences de l'activation ou non de ces gènes témoignent bien de leur rôle dans la cartographie du développement dentaire. Dans la régénération dentaire, il peut être utile de chercher à retrouver le schéma embryologique et de connaitre les gènes qui entrent en jeu ainsi que les processus moléculaires complexes qui y sont associés. (Bei, 2009 ; Jamal, 2016)

2.3 **Matrice extra-cellulaire**

La Matrice extra-cellulaire joue un rôle important dans la régulation du comportement cellulaire puisqu'elle influe sur la survie, la morphogenèse, l'adhésion, la migration, la prolifération et la différenciation cellulaire. (Vishwakarma et al, 2015)

La matrice extra-cellulaire (MEC) peut profiter à l'ingénierie tissulaire de trois manières différentes :

- elle peut être utilisée comme une matrice de support ;
- elle peut être associée à un biomatériau naturel ou synthétique ;
- elle sert de modèle pour créer un « échafaudage », une trame décellularisée de support tridimensionnel idéal. (Atala, 2005 ; Faulk & al, 2014)

Si elle est utilisée comme matériau de support, elle doit être prélevée au niveau des tissus puis séparée des cellules pour la rendre acellulaire.

Cette même matrice décellularisée peut être associée à un biomatériau de support et potentialiser son action en lui permettant de générer des structures plus complexes.

Enfin, une fois étudié, ce milieu idéal pour les cellules *in vivo* est reproduit *in vitro* : on recrée des matrices tridimensionnelles, en s'inspirant de sa composition. (Scheller & al, 2009 ; Fukumoto, 2018)

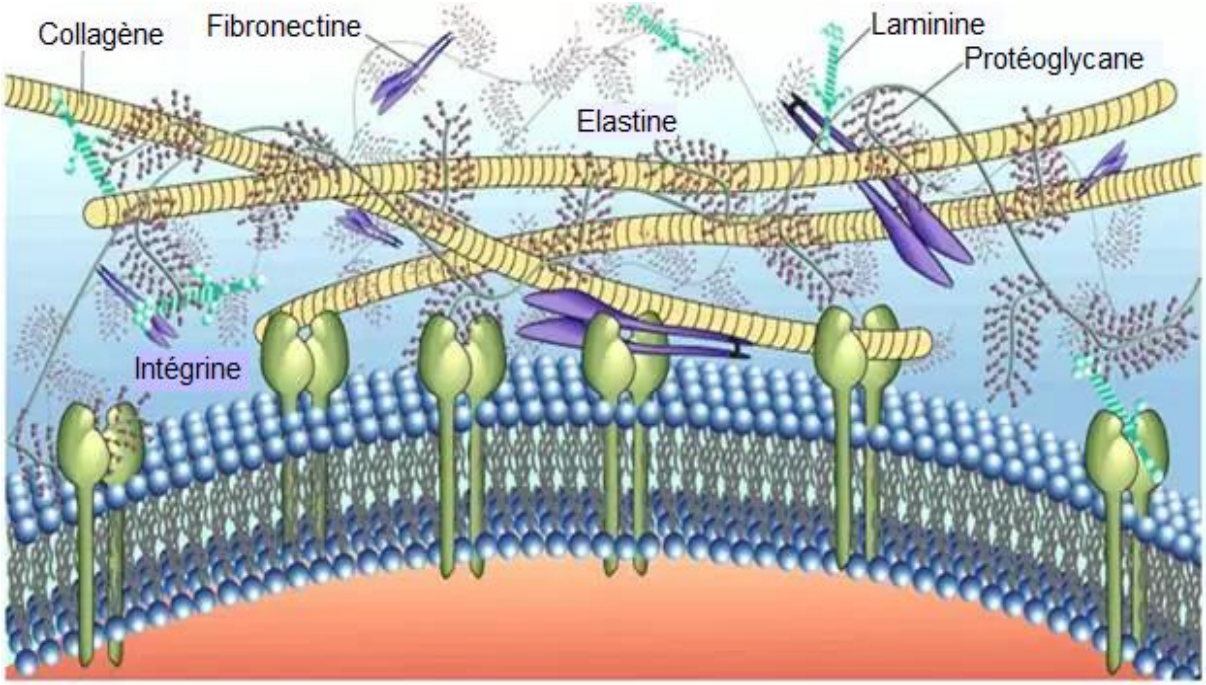

Figure 15 : Composition de la matrice extra-cellulaire (Source : Lieff, 2018)

3 Biomatériaux de support tri-dimensionnel

Le but de cette matrice tridimensionnelle ou échafaudage est de servir de support aux cellules et de permettre leur différenciation. Pour cela, on utilise des matériaux qui permettront notamment de mimer la matrice extra-cellulaire et de recréer un milieu de développement optimal. (Bécavin, 2015)

On trouve donc deux classes de biomatériaux : les polymères naturels et les polymères synthétiques. Il existe aussi parallèlement à cela, une famille de matériaux dits Hydrogels, (synthétiques ou naturels) qui présentent des propriétés très intéressantes équivalentes aux tissus conjonctifs.

3.1 Critères de choix des matériaux

Les critères de choix du biomatériau sont les suivants :

- Biocompatibilité : il doit être inerte, non carcinogène et non immunogène
- Perméabilité/porosité : il doit être compatible avec la colonisation et permettre la conductivité cellulaire
- Adhésion, prolifération et différenciation cellulaire possible
- Structure permettant une nouvelle vascularisation
- Transport des molécules sans les affecter
- Dégradation contrôlée
- Propriétés mécaniques adéquates (Bécavin, 2015)

Figure 16 : Exemple de matrice tridimensionnelle d'une molaire (Source : Bécavin, 2015)

3.2 **Polymères d'origine naturelle**

3.2.1 Matériaux utilisés

Les polymères d'origine naturelle que l'on cite régulièrement comme biomatériaux potentiels sont les suivants :

- Le collagène

Il s'agit de la protéine la plus abondante et ubiquitaire du corps humain. On la retrouve dans les tissus tels que l'os, la dentine, la matrice extra-cellulaire etc. Il est déjà utilisé cliniquement dans la régénération osseuse guidée (ROG).

Pour la régénération de l'organe dentaire, on utilise des éponges collagéniques qui permettent une adhésion efficace, une prolifération des cellules et une minéralisation. (Sumita & al, 2006) De plus, la protéine est facilement dissociable et purifiable grâce à l'hydrolyse enzymatique (on utilise l'enzyme Pepsine). (Schmidt et al, 2016)

On peut lui reprocher cependant un fort taux de dégradation conduisant à une perte rapide des propriétés mécaniques. (Bécavin, 2015)

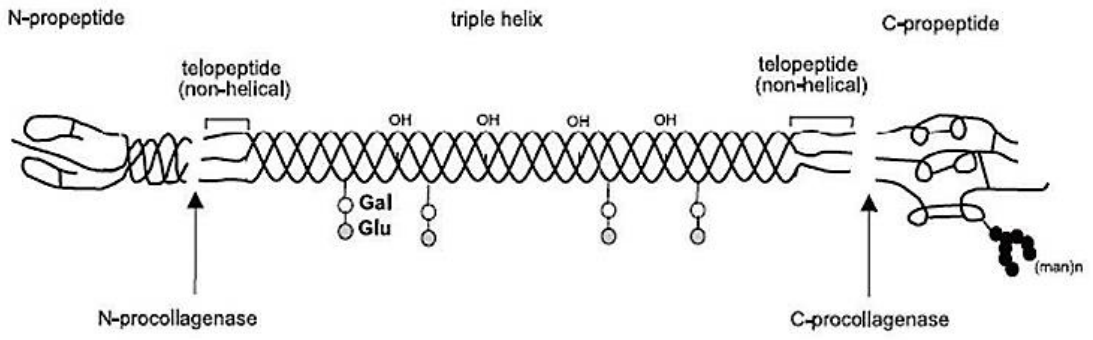

Figure 17 : Représentation schématique de la protéine de collagène (Source : Vigier, 2008)

En plus du collagène, on peut également citer l'élastine et la fibrilline comme composants de la MEC. Il s'agit de glycoprotéines dont l'utilisation est étudiée en ingénierie tissulaire.

- L’alginate

Il s’agit d’un polysaccharide naturel obtenu à partir d’algues brunes. Il est déjà utilisé dans l’ingénierie tissulaire du cartilage et semble très efficace dans la régénération osseuse. (Atala, 2005 ; Bécavin, 2015)

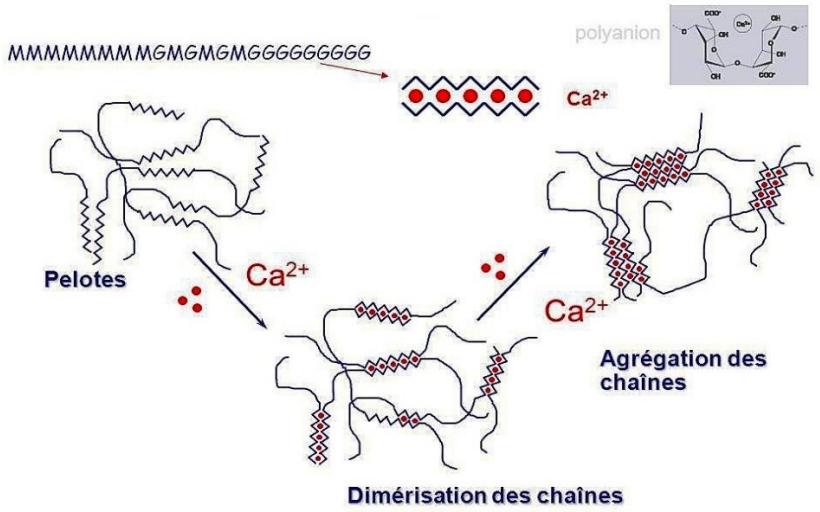

Figure 18 : Représentation schématique du mécanisme de gélification des alginates (Source : Jouanneau, 2007)

- Le chitosan

Le chitosan un polymère dérivé de la chitine. Il peut être utilisé en association avec le collagène. (*Bécavin, 2015*)

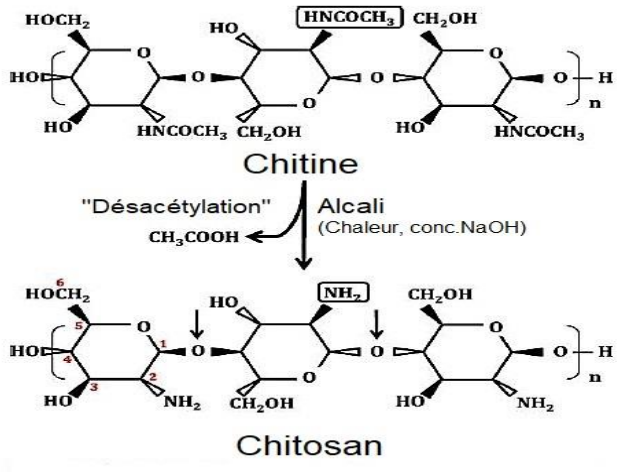

Figure 19 : Production et structure chimique du chitosan (Source : Varan, 2017)

- La soie

Les protéines de la soie sont biocompatibles, biodégradables et non immunogènes.

Tout comme le collagène, elles sont déjà utilisées dans la régénération osseuse. Elles semblent également prometteuses dans la génération de tissus minéralisés même si pour l'instant aucun tissu dentaire n'a été obtenu. En ingénierie tissulaire elle est utilisée sous la forme de fibroïne de soie. (Ramier, 2012 ; Bécavin, 2015)

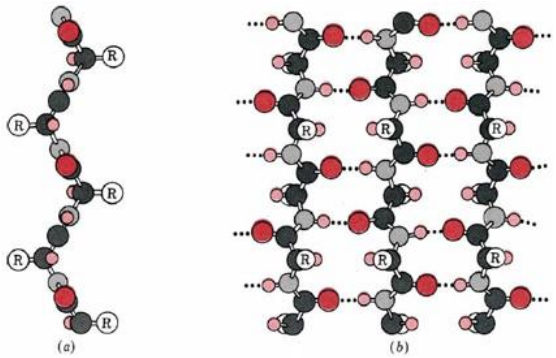

Figure 20 : Formation de la structure protéique secondaire de la soie (Source : Vitz, 2016)

- L'hydroxyapatite

L'hydroxyapatite est synthétisée naturellement par l'organisme et se trouve être un constituant essentiel de l'os (60%), de l'émail ou encore de la dentine. Elle est dotée par conséquent d'une très grande biocompatibilité. [*Marx, 2015*] Elle présente cependant une faible résorption naturelle, elle est donc préférablement associée à du Phosphate Tricalcique pour donner l'Hydroxyapatite/Phosphate Tricalcique (HA/TCP).

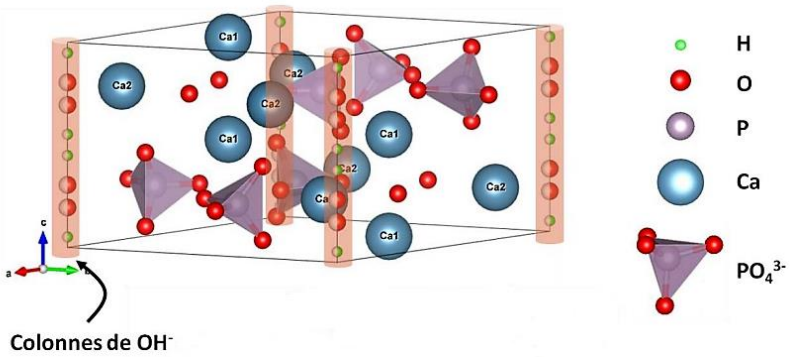

Figure 21 : Représentation schématique de la structure cristalline de l'hydroxyapatite (Source : Leroy, 2017)

- Le phosphate de Calcium

Il constitue la partie minérale de l'os et possède une excellente biocompatibilité ainsi que de remarquables résultats en termes d'adhérence, de prolifération et de différenciation ce qui lui confère des propriétés bioactives et ostéo-conductrices plus qu'intéressantes. (Vishwakarma et al, 2015)

Son utilisation et celle de HA/TCP en ingénierie tissulaire s'est beaucoup développée du fait de leur composition voisine de celle de la phase minérale de l'os. (Ramier, 2012)

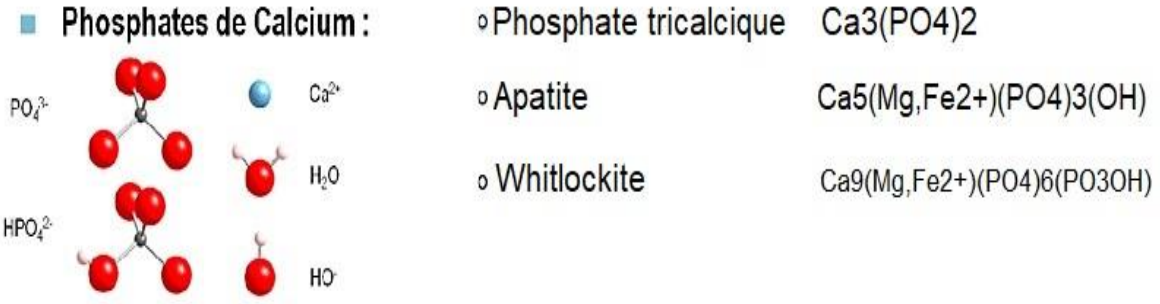

Figure 22 : Les différentes formes de Phosphates de Calcium identifiés (Source : Gras, 2014)

3.2.2 Avantages et inconvénients

Les polymères d'origine naturelle possèdent une grande résistance. De plus, ils permettent évidemment une parfaite biocompatibilité avec les tissus et sont biorésorbables après implantation.

Certains de ces polymères comme l'alginate ou le collagène peuvent être utilisés comme « encre biologique » et sont manipulables par imprimante 3D.

Néanmoins ces biomatériaux peuvent générer une réponse hostile de l'hôte et un rejet immunitaire. Ils peuvent également être vecteurs d'organismes pathogènes et engendrer un risque d'infection croisée s'ils sont d'origine animale. (Yuan & al, 2011 ; Ramier, 2012)

3.3 **Polymères synthétiques**

3.3.1 Matériaux disponibles

Chez les matériaux synthétiques on peut citer par exemple :

- L'acide Poly-L-glycolique (PGA)

Il s'agit d'un polymère hautement cristallin biodégradable, biocompatible et thermoplastique, le plus pertinent cliniquement. Il est aussi utilisé par exemple dans la fabrication de fils de suture absorbables. (Atala, 2005 ; Vishwakarma et al, 2015)

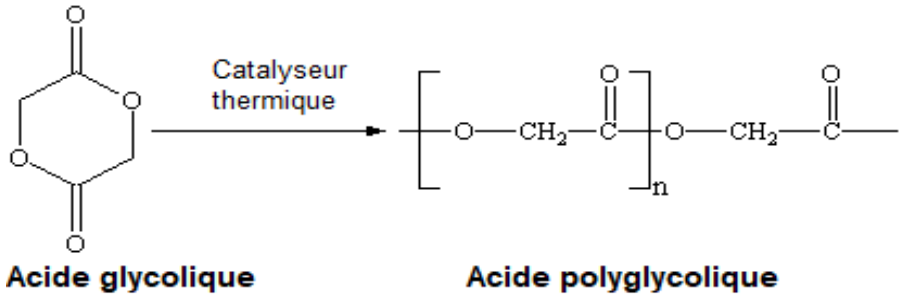

Figure 23 : Représentation schématique de la synthèse d'acide polyglycolique (Source : Bélime, 2013)

- L'acide poly-L-lactique (PLLA)

Il s'agit d'un polymère cristallin similaire mais plus flexible que l'acide glycolique, biocompatible, entièrement biodégradable, utilisable avec une imprimante 3D. (Vishwakarma et al, 2015)

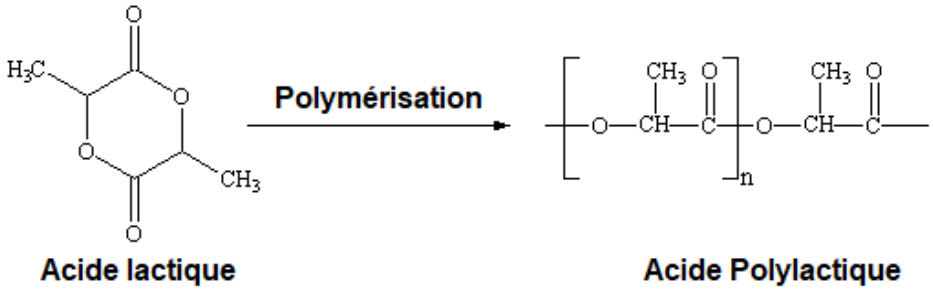

Figure 24 : Représentation schématique de la synthèse d'Acide Polylactique (Source : Bélime, 2013)

- L’acide poly-lactique-co-glycolique (PGLA)

Il s’agit d’un polyester synthétique biodégradable, biocompatible qui peut cependant provoquer une légère réaction inflammatoire de l’hôte.

Une fois associé au Phosphate tricalcique, il donne de meilleurs résultats dans la culture des DPSCs que HA/TCP (Bécavin, 2015).

- Le Polyétheréthercétone ou PEEK

Il s’agit d’un thermoplastique semi-cristallin. Il a été largement utilisé pour la préparation d'échafaudages d'ingénierie tissulaire notamment pour la régénération osseuse. En effet, il présente une grande compatibilité, de bonnes propriétés mécaniques, des propriétés de fabrication idéales et une stabilité thermique. Le problème de son taux de dégradation trop faible peut être résolu par l’association avec du PGA. (Shuai et al, 2016 ; Rocchi, 2016)

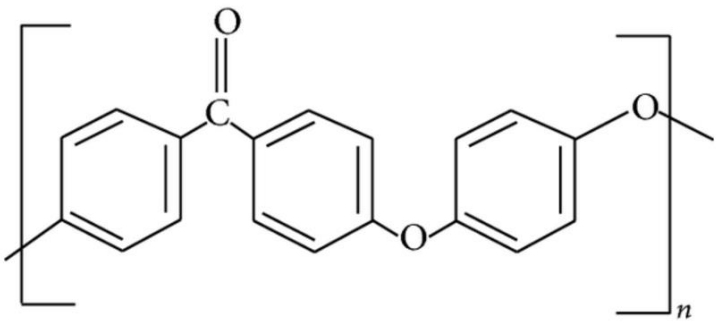

Figure 25 : Structure chimique du PEEK (Source : Najeeb & al, 2015)

Ces polymères sont principalement utilisés comme pansements, sutures et prothèses endovasculaires mais peuvent également prendre part au développement de la médecine régénérative.

Leurs produits de dégradations sont des métabolites naturels éliminés par le corps sous forme de dioxyde de carbone et d’eau ; ce mécanisme d’hydrolyse peut néanmoins conduire à un effondrement prématuré de la structure. (Atala, 2005 ; Coudane, 2014).

3.3.2 Avantages et inconvénients

Ces biomatériaux permettent un bon contrôle du poids moléculaire, de la configuration des chaînes ou de la présence d'un groupe moléculaire fonctionnel. De plus, ils disposent de propriétés mécaniques et chimiques idéales. Leur thermoplastie en fait des matériaux idéalement manipulables en ingénierie tissulaire.

En revanche, leur résorption peut provoquer une importante réaction inflammatoire de l'hôte. (Yuan & al, 2011)

Tableau 4 : Tableau récapitulatif des avantages et des inconvénients des deux familles de biomatériaux (Source : Document personnel)

	Biomatériaux Naturels	**Biomatériaux Synthétiques**
Avantages	- Biocompatibilité - Biodégradables - Manipulation aisée	- Propriétés mécaniques - Propriétés chimiques - Bon contrôle de la configuration - Thermoplastie
Inconvénients	Précautions à mettre en place pour éviter : - Rejet immunitaire de l'hôte - Risque d'infection croisée	- Réaction inflammatoire rare mais possible

PARTIE II : DESCRIPTION DES TECHNIQUES D'INGENIERIE

À mesure que nous comprenons mieux l'odontogenèse, la localisation des niches de cellules souches, les biomatériaux disponibles et les mécanismes de régénération, il devient possible d'imaginer une méthode de remplacement biologique des dents absentes.

Une dent développée par génie tissulaire fonctionnelle doit inclure la génération d'une couronne, d'une racine et d'un ligament parodontal avec des afférences nerveuses et sanguines. (Tatullo & al, 2015)

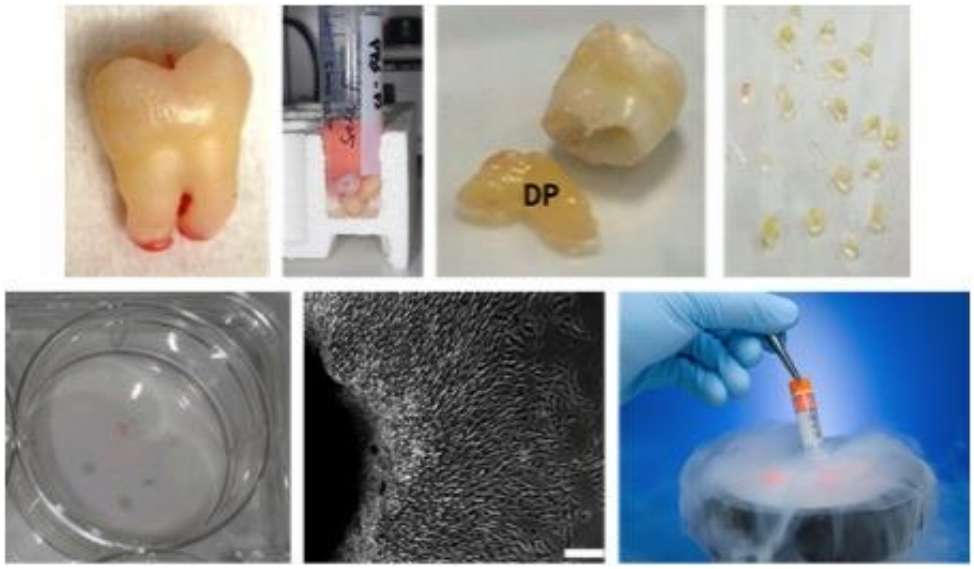

Figure 26 : Manipulation des cellules souches en bio-ingénierie dentaire (Source : Farges, 2016)

Récemment, de nombreuses études basées sur le remplacement de la dent entière par manipulation cellulaire tridimensionnelle ont été menées sur un modèle murin. Des preuves supplémentaires sont nécessaires afin de rendre possible l'application sur l'Homme : à partir de la régénération dentaire sur un modèle de type grand animal et à partir de sources cellulaires post-natales. (Ohazama & al, 2004 ; Ono & al, 2017)

Dans cette partie, nous décrirons les différentes approches connues pour développer un organe dentaire entier et fonctionnel efficacement, les expérimentations actuelles sur l'animal et leur éventuelle application future sur l'Homme.

1. Préalables : définitions et rappels

1.1 L'ingénierie tissulaire

1.1.1 Terminologie

La médecine régénérative est un domaine thérapeutique qui vise à remplacer les tissus et organes endommagés par des traumatismes, des maladies ou des problèmes congénitaux. Elle s'oppose à la stratégie clinique traditionnelle qui se concentre sur le traitement des symptômes.

Les outils utilisés pour aboutir à ces résultats sont l'ingénierie tissulaire, la thérapie cellulaire, les dispositifs médicaux et organes artificiels. (McGowan, 2018) Ce domaine est en plein essor et vise à apporter une solution au problème des dons d'organes, aux risques de rejet immunitaire et à la sénescence tissulaire. (Keller, 2012)

Le terme d'ingénierie tissulaire est introduit pour la première fois par *Langer & Vacanti* en 1993. Cette biotechnologie intervient dans le domaine régénératif en combinant cellules, échafaudages tri-dimensionnels et molécules biologiquement actives. Son but est d'assembler des structures fonctionnelles qui restaurent, entretiennent et renouvellent les tissus endommagés ou les organes lésés (Heemskerk, 2013). Cette technique trouve son inspiration dans des méthodes d'ingénierie et de biologie visant à constituer un arsenal thérapeutique très prometteur. (Sari, 2014)

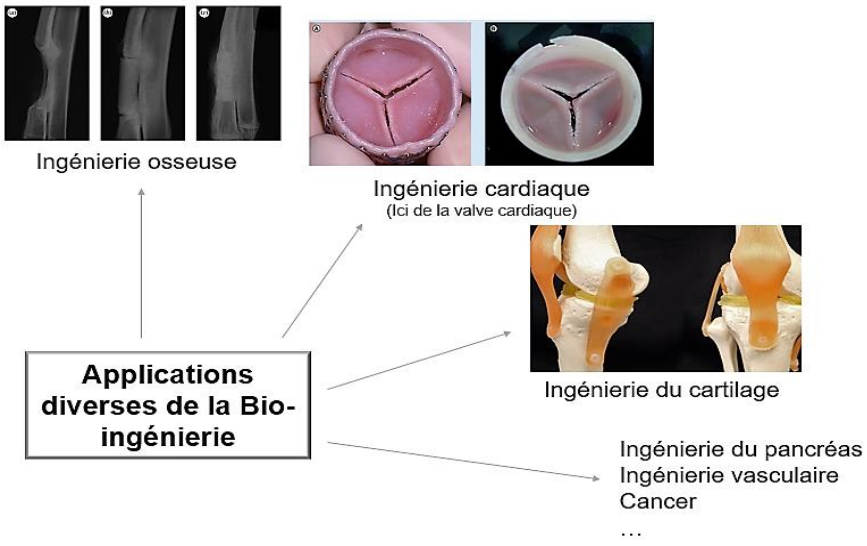

Figure 27 : Les diverses applications de l'ingénierie tissulaire (Source : Semino, 2013)

La régénération physiologique d'organes complet existe déjà chez diverses espèces, principalement chez les plantes et certains animaux diblastiques et amphibiens qui sont capables de remplacer les organes endommagés.

Cette capacité est bien plus restreinte chez les mammifères et se limite à des tissus aux capacités régénératrices contenant des cellules souches.

Dans notre cas, l'objectif est de reconstituer une organe dentaire entier, fonctionnel et intégré dans son milieu buccal habituel. A ce jour, deux techniques ont été étudiées. La première est basée sur l'utilisation de matrice ou échafaudage tridimensionnel pour guider la croissance et la morphogenèse du futur organe dentaire. La seconde a recours à l'agrégation cellulaire et s'appuie sur le biomimétisme grâce à l'étude du développement embryologique et de la croissance dentaire. (Sari, 2014)

1.1.2 Concepts

L'ingénierie peut s'appliquer à divers niveaux d'implications, de l'action stimulante au rôle régénérateur.

- Approche conductive

Le biomatériau a un rôle passif et guide la régénération d'un tissu existant lésé. On peut citer en exemple le rôle de la membrane en régénération tissulaire guidée.

- Approche inductive

Des cellules compétentes à proximité d'un défaut tissulaire sont recrutées et activées grâce à des signaux spécifiques (facteurs de croissance, molécules bioactives).

- Transplantation cellulaire

Des cellules compétentes sont prélevées chez l'individu puis mises en culture. Elles

sont ensuite ensemencées sur un biomatériau de support et réimplantés dans l'organisme. (Sari, 2014)

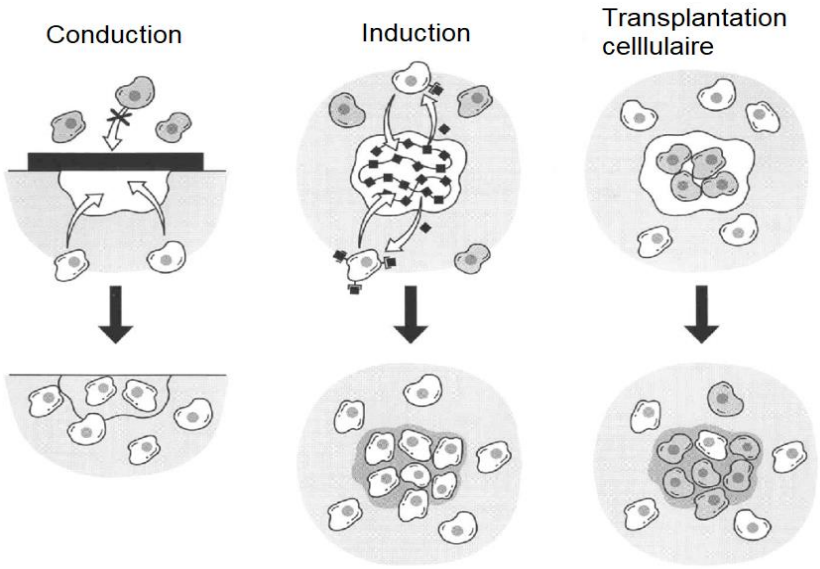

Figure 28 : Illustration des trois approches d'ingénierie tissulaire (a) Dans l'approche conductrice, un échafaudage peut servir de barrière pour contrôler les cellules qui risquent d'infiltrer le site du défaut, puis va initier la réparation. La barrière peut être résorbée avec le temps ou retirée chirurgicalement. (b) Les approches inductives impliquent la libération de molécules bioactives qui ne se lient qu'à des cellules hôtes spécifiques avec des récepteurs aux molécules. Les cellules désirées migrent dans le défaut et commencent à déposer une nouvelle matrice extracellulaire. (c) Pour la transplantation cellulaire, les cellules provenant d'une source donneuse sont ensemencées directement sur un support en polymère in vitro et la construction cellule/support est ensuite implantée dans le site du défaut. (Source : Alsberg & al, 2001)

La régénération de l'organe dentaire implique l'utilisation de la 3ème technique. Cette dernière est dans notre cas motivée par la compréhension du développement embryonnaire et par le potentiel des cellules souches.

Cette approche a pour objectif à terme le développement d'organes parfaitement fonctionnels.

La dent est un organe facilement accessible et son organogenèse est bien connu, ce qui en fait un candidat idéal pour la recherche. A ce jour, on peut mettre en parallèle deux approches différentes : la technique de bio-ingénierie axée sur l'utilisation d'un échafaudage, et la technique d'agrégation cellulaire et de germe d'organe.

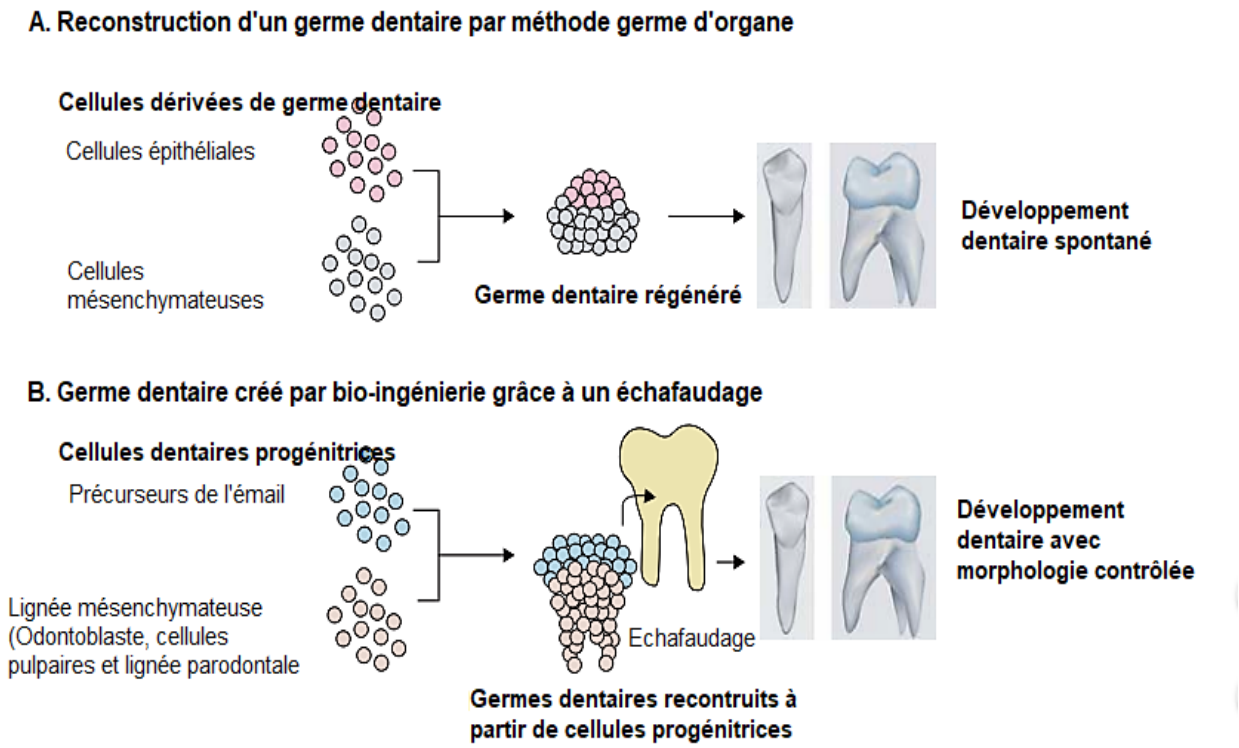

Figure 29 : La régénération dentaire à partir de cellules individuelles (Source : Ikeda & Tsuji, 2008)

L'ingénierie tissulaire dans le domaine dentaire est régulièrement étudiée sur la souris pour plusieurs raisons. Le taux de reproduction élevé des souris ainsi que leur vitesse de croissance permettent d'observer des résultats expérimentaux très rapidement. Les germes sont facilement prélevables et la culture est aisée.

De plus, le développement dentaire murin est très similaire à l'Homme donc les résultats seront éventuellement transposables. (Bécavin, 2015)

1.2 Rappels d'odontogenèse

L'objectif de certaines approches d'ingénierie tissulaire est de reproduire l'odontogenèse. Pour cela, le développement embryologique est étudié chez la souris puisqu'il est comparable à celui de l'Homme.

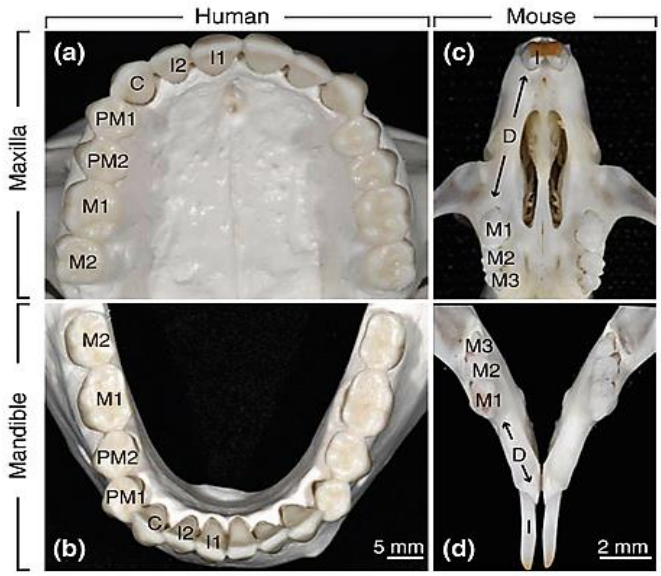

Figure 30 : Photographies comparatives des dentures humaine et murine. Ici, on observe la denture adulte jeune chez l'Homme (avant l'apparition des troisièmes molaires). (Source : Jheon & al, 2013)

Chez l'Homme, le développement dentaire des dents déciduales débute dès la sixième semaine de gestation ; l'organogenèse de la denture permanente quant à elle ne prend fin que vers 18-25 ans.

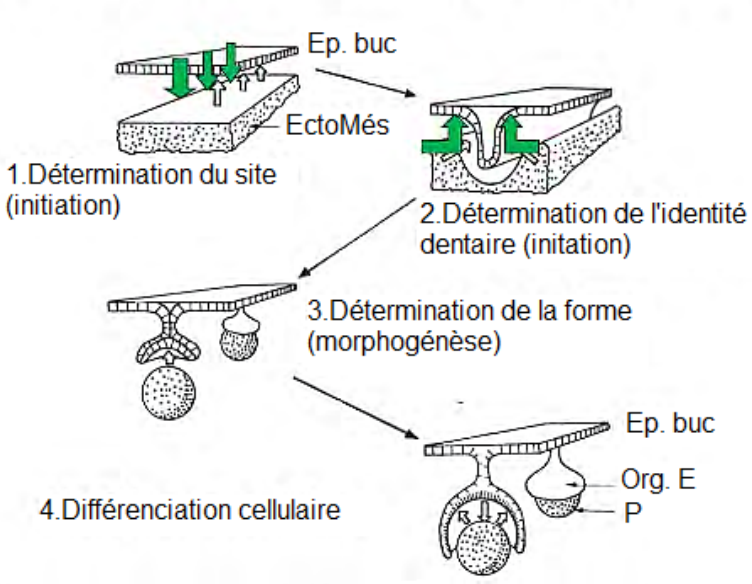

Figure 31 : Représentation schématique de la chronologie de l'odontogenèse. L'organe dentaire est issu de deux tissus bien distincts : l'épithélium buccal et l'ectomésenchyme. (Source : Sari, 2014)

L’épithélium buccal est présent lors de la formation de l’émail de la dent puis disparaît au cours de l’éruption tandis que l’ectomésenchyme qui est sous-jacent développera la dentine coronaire, puis la racine dentaire.

Ainsi, le développement dentaire se caractérise par un enchaînement de phases.

- Phase d’initiation

Il s’agit de la première phase du développement dentaire. Elle permet de déterminer les régions spécifiques pour chaque classe dentaire dans les arcs mandibulaires et maxillaires et aboutit à la formation de la lame dentaire.

L’odontogenèse est initiée par l’épaississement et l’invagination de l’épithélium dans le mésenchyme sous-jacent dérivant de la crête neurale. (Jussila & al, 2013)

A ce stade, les interactions épithélio-mésenchymateuses se mettent en place : l’épithélium entre dans une phase d’induction du huitième jour embryonnaire (JE8) au JE10. Ceci entraine une cascade de signalisation chez les cellules de la crête neurale et la régionalisation des arcs pharyngés de JE9 à JE11.

Ces interactions réciproques sont médiées par la membrane basale qui sépare l’épithélium du mésenchyme et impliquent des éléments de la matrice extracellulaire, des récepteurs cellulaires et des molécules diffusibles (TGF-β, FGF, Wnt, Hedgehog etc). (Keller, 2012) A partir de JE11 c’est l’ectomésenchyme qui prend le relais et devient inducteur.

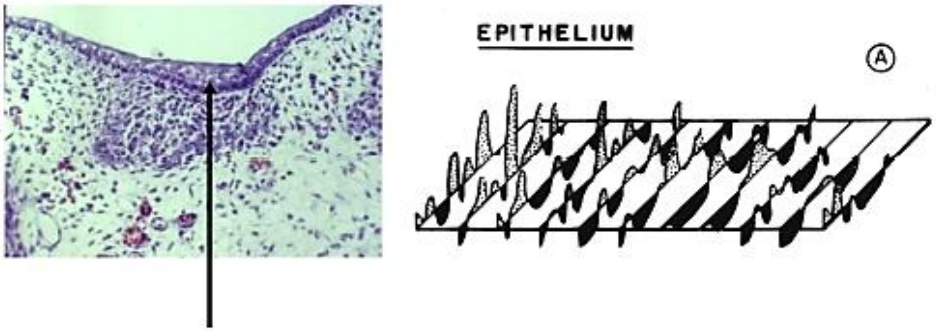

Figure 32 : Formation de l’épithélium odontogène (Source : Nefussi, 2013)

- Phase d'histomorphogenèse

La phase suivante implique les phénomènes de prolifération cellulaire, de migration et d'apoptose.

Elle est caractérisée par les stades de lame, de bourgeon, de capuchon et de cloche.

Chez la souris à JE13, se forme le bourgeon dentaire : l'épithélium continue à s'invaginer dans le mésenchyme puis l'entoure pour former le capuchon (JE14), puis la cloche (JE16).

Tout ceci est contrôlé par un centre de signalisation situé à la pointe du bourgeon dentaire, appelé nœud de l'émail. Le mésenchyme se retrouve complètement enfermé dans l'épithélium au stade avancé de la cloche (JE18). (Tucker & Sharpe, 2004 ; Nait Lechger & al, 2009)

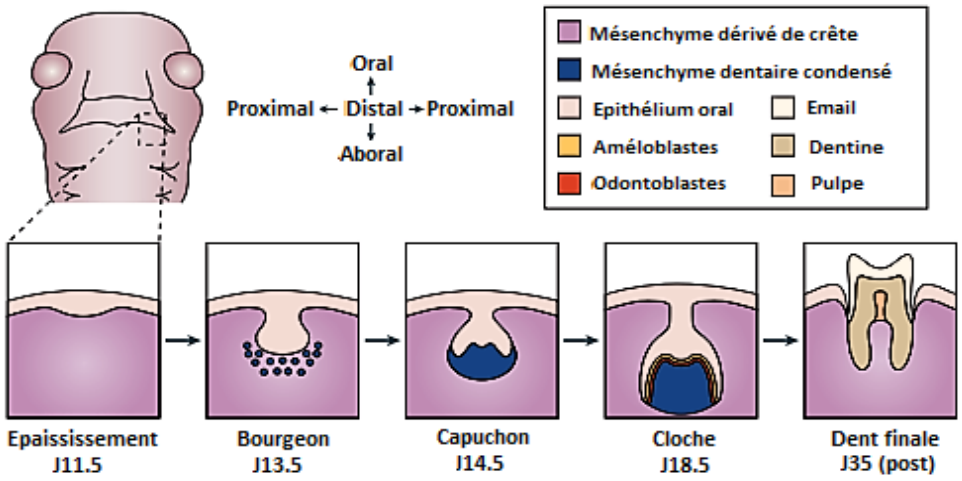

Figure 33 : Les stades du développement embryonnaire chez la souris (Source : Tucker & Sharpe, 2004)

- Phase de différenciation fonctionnelle

Elle suit la phase d'histomorphogenèse, pendant le stade de la cloche.

Les cellules mésenchymateuses se différencient en précurseurs de la dentine, les odontoblastes. Puis les cellules épithéliales en précurseurs de l'émail, les améloblastes. (Tucker & Sharpe, 2004 ; Sari, 2014)

- Phase finale

Enfin, la dernière phase concerne la formation de la partie radiculaire par le développement apical de la lèvre épithéliale.

Les cellules issues du sac folliculaire au contact de la pré-dentine donnent des cémentoblastes (puis le cément) et les cellules épithéliales donnent la gaine de Hertwig.

Pour finir, l'éruption dentaire fait intervenir les étapes de remodelage osseux. Le processus éruptif est un phénomène systémique complexe qui commence par la phase pré-éruptive qui implique la croissance folliculaire et la migration intra-osseuse.

Vient ensuite le phénomène éruptif qui débute par une phase intra-osseuse, puis extra-osseuse jusqu'au contact occlusal.

Enfin lors de l'étape post-éruptive, les mouvements d'adaptation à l'occlusion se mettent en place et l'usure de l'émail commence. (Tucker & Sharpe, 2004)

- Vascularisation

La vascularisation se développe à partir de deux phénomènes, la vasculogenèse et l'angiogenèse.

Le premier réseau vasculaire se développe à partir de la vasculogenèse grâce au développement des cellules souches à l'origine des cellules endothéliales.

A partir de ce réseau commence la croissance des vaisseaux et capillaires collatéraux vers les organes : l'angiogenèse. La papille est vascularisée dès le stade de la cloche avec les troncs principaux parallèles au futur grand axe de la dent. (Keller, 2012 ; Jussila & al, 2013)

- Innervation

Les axones sensitifs (ganglion trigéminal) et sympathiques (ganglion cervical supérieur) apparaissent à JE10. L'organe dentaire est une des cibles principales du ganglion trigéminal pour l'innervation sensorielle du nerf facial V (V2 maxillaire et V3 mandibulaire). A JE12 et JE13, ses fibres ont été détectées à proximité du mésenchyme du germe dentaire. Au 2ème ou 3ème jour après la naissance (post-natal, PN2 et PN3), les fibres nerveuses pénètrent dans la papille dentaire et dans la couche d'odontoblastes. (Keller, 2012 ; Jussila & al, 2013)

Une dent est finalement formée à la suite de l'intégration de réponses cellulaires spatiotemporelles, telles que la prolifération, l'apoptose, la différenciation, le mouvement et la polarisation. Le nombre de germes dentaires formés au cours de la période embryonnaire détermine ensuite le nombre de dents de l'individu.

Ces conclusions suggèrent qu'il devrait être possible de générer des tissus spécifiques et même de faire « pousser » des dents de remplacement en contrôlant la cytodifférenciation et l'organogenèse. (Nakao & Tsuji, 2008)

2. Technique in vivo avec matrice tri-dimensionnelle

Au début des années 1990, Langer & Vacanti ont mis au point un nouveau concept, l'ingénierie tissulaire. L'enjeu était de produire des tissus biologiques ou des organes entiers en chargeant un échafaudage préfabriqué et biodégradable de cellules spécialisées capables de générer le tissu ou l'organe en question.

Des recherches ultérieures ont déterminé les principes de conception et de fabrication possibles de dents biologiques entières. Plusieurs techniques de production de dents biologiques par génie tissulaire impliquant l'utilisation d'une matrice ont déjà été rapportées. (Honda & al, 2008)

2.1 Principes

Cette technique consiste à ensemencer un complexe cellulaire, souvent prélevé embryologiquement (stade bourgeon ou cloche) sur une matrice tri-dimensionnelle biodégradable, préfabriquée, souvent de la forme d'une dent. Cette procédure a déjà été utilisée pour reconstituer des tissus tels que le cartilage et l'os.

Le problème des cellules souches *in vitro* est qu'elles ne prolifèrent pas de façon tridimensionnelle mais en monocouches. Il est donc difficile d'avoir un développement hautement régulé (Schulze & Tobiasch, 2012) d'où l'importance d'une structure de support optimisée.

2.1.1 Fabrication de l'échafaudage

La fabrication de la matrice et la manipulation du biomatériau doivent réunir certains critères afin d'optimiser la réussite du procédé.

La topographie, la composition et la régularité de la structure influent sur le comportement des cellules, leur adhésion et leur alignement, ainsi que sur l'intégration et la biocompatibilité du dispositif. (Dualibi & al, 2008)

D'autre part, certains échafaudages tels que les matrices collagéniques, sont dégradés *in vivo* par activité lysosomique. Moins la matrice est dense, plus la taille des

pores va être importante et plus la dégradation va être rapide. Cette dégradation doit correspondre à la vitesse à laquelle le nouveau tissu est formé sans engendrer de sous-produits nocifs. (Atala, 2005 ; Sharma, 2014)

Enfin, la forme, le conditionnement, sous lequel apparaît le matériau influence la réponse biologique et peut varier de manière significative. On dispose de gels, mousses, éponges ou fibres.

La difficulté principale est de permettre la fabrication d'un implant cliniquement pertinent en intégrant les fonctions à l'échelle micro- ou nanométrique. (Figure 34)

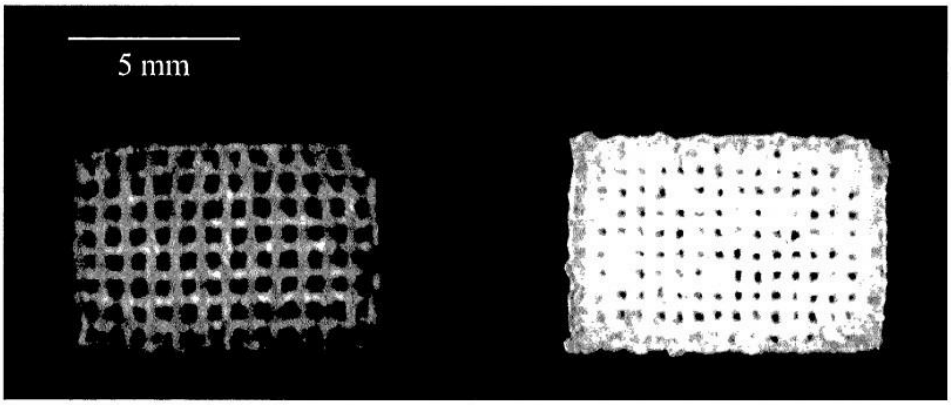

Figure 34 : Un aperçu d'un biomatériau créé par impression 3D pour application sur l'Homme et de l'échelle de ses pores. (Source : Montalbano, 2018)

En ingénierie tissulaire, les techniques de fabrication de l'échafaudage sont nombreuses et varient notamment en fonction de la topographie recherchée et du matériau utilisé.

- Procédés de fabrication

- Techniques de filage, tressage ou tissage :

Elles permettent une manipulation des fibres à la manière d'un textile. Ces techniques sont idéales pour obtenir des pores réguliers.

- Technique de frittage :

Cette technique nécessite l'utilisation de micro-grains qui se soudent sous l'effet de la chaleur et permettent de former des structures tri-dimensionnelles. (Sharma & al, 2014)

- Technique de moulage :

Ce procédé implique la création d'un moule d'une dent en négatif, puis l'injection ou l'apposition d'un biomatériau.

On peut notamment citer Dualibi & al qui ont décrit la manipulation de fibres de PGA contenant 3% de PLLA (Acide Poly-L-lactique) dans un moulage en chloroforme d'une dent. Le tout sera ensuite lyophilisé, rincé et désinfecté afin de générer une matrice tri-dimensionnelles implantables dans la mâchoire d'un rat. (Duailibi & al, 2004)

Les hydrogels de fibrine, eux, sont injectables puis moulés en trois dimensions. (Sharma & al, 2014)

- Photopolymérisation :

Il est possible pour certains composites synthétiques, d'obtenir une configuration tri-dimensionnelles après photo-polymérisation, le plus souvent par irradiation aux rayons ultraviolets.

Cette technique est souvent privilégiée par rapport à l'utilisation de l'action thermique, moins fiable et susceptible d'altérer les propriétés des biomatériaux. (Pereira & Bartolo, 2015)

- Peptides auto-assemblants :

Ils sont utilisés à l'échelle nanométrique, très étudiés actuellement et souvent évoqués dans les récentes publications.

Ces recherches sont basées sur la compréhension des structures supra-moléculaires assemblées naturellement, transposée à la synthèse de matériaux synthétiques. Ces

peptides peuvent soutenir l'encapsulation cellulaire et possèdent des propriétés physiques améliorées.

Pour l'heure, cette technique est principalement applicable dans la régénération de la pulpe dentaire et favorise également la reminéralisation de l'émail en fournissant un échafaudage biomimétique. (Kyle & al, 2010 ; Koutsopoulos, 2018)

- Technique d'électro-spinning :

Elle permet de fabriquer des structures constituées de nanofibres de polymères enchevêtrés de façon aléatoire. Une différence de potentiel électrique entre une aiguille et un collecteur permet la formation d'un jet de solution de polymères qui va se solidifier. (Bécavin, 2015)

Les échafaudages obtenus sont déjà employés dans le domaine dentaire pour produire des membranes gélatineuses dans la régénération des tissus parodontaux. La construction de matrices de topographie plus complexe ou de géométrie de pores pré-conçue, reste cependant pour le moment limitée. (Gupte & Ma, 2012)

- Fabrication par impression 3D :

Les dernières décennies voient apparaitre l'utilisation de l'impression 3D dans la fabrication des matrices de support en ingénierie tissulaire.

Cette technique est déjà utilisée dans l'ingénierie osseuse, elle permet la conception d'une structure poreuse aux dimensions précises et avec une morphologie interne complexe.

On obtient une excellente résolution et ce, très rapidement, mais certains polymères liquides sont parfois peu disponibles et la liaison des charges est faible. (Schulze & Tobiasch, 2012 ; Shao & al, 2018)

En pratique, pour construire un échafaudage de support au développement d'une dent par impression 3D, le praticien peut calquer la topographie de la matrice dentaire, sur l'anatomie de la dent controlatérale du patient (si celle-ci est saine) en la cartographiant

grâce à une radiographie tomodensitométrique. Il peut aussi s'inspirer de normes anatomiques publiées. (Gupte & Ma, 2012) (Figure 35)

La fabrication se fait par apposition de couches successives du matériau jusqu'à obtention de la structure souhaitée. Il est aisé de créer des microbrins tridimensionnels répétés et des micro-canaux interconnectés. L'échafaudage est ensuite stérilisé, très souvent dans l'oxyde d'éthylène pendant 24h.

Aujourd'hui, les imprimantes 3D sont capables de distribuer le plastique, la céramique, les biomatériaux et même les cellules de manière très organisée. De plus, l'impression 3D permet d'offrir des soins personnalisés à chaque patient. (Smith & Yelick, 2016)

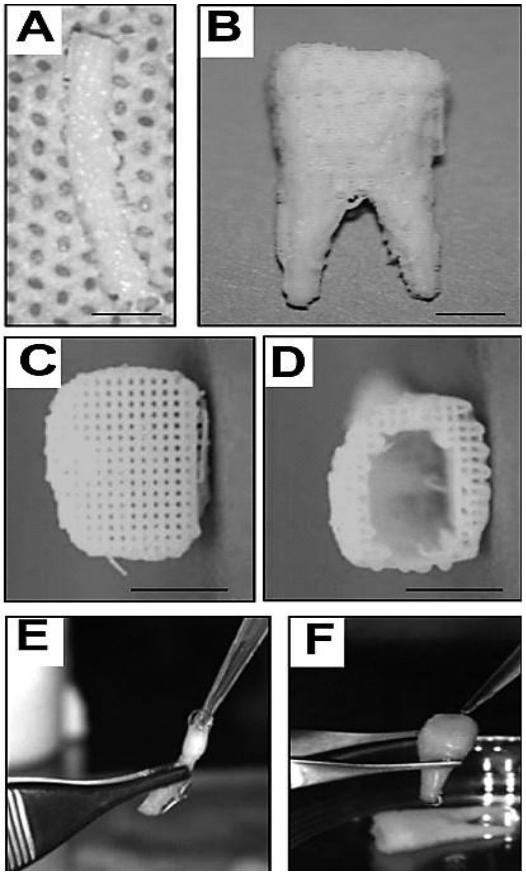

Figure 35 : Design et fabrication d'un échafaudage dentaire de forme anatomique chez l'homme et le rat par impression 3D. Les formes anatomiques d'une incisive centrale mandibulaire de rat (**A**) et d'une première molaire humaine (**B**) ont été utilisées pour la reconstruction tri-dimensionnelle et la bio-impression d'une matrice hybride avec des micro-brins et des micro-canaux interconnectées qui servent de conduits pour abriter les cellules et pour l'angiogenèse (**C**,**D**). Un mélange de facteurs de croissance a été adjoint à du collagène de type I et a été injecté dans les micro-canaux de l'échafaudage pour l'incisive du rat (**E**) et la molaire humaine (**F**). (Source : Schulze & Tobiasch, 2012)

- Formation des pores :

Les pores quant à eux sont obtenus soit par topographie d'assemblage avec le tissage, le filage, l'impression 3D etc, soit par création *a posteriori* grâce à un lessivage sélectif ou par séparation de phase dues à des réactions ou des formations gazeuses.

- Adjonction de molécules bioactives

On connait déjà plusieurs facteurs de croissance importants qui interviennent dans le développement naturel des dents, notamment la protéine morphogénétique osseuse (BMP), le facteur de croissance fibroblastique (FGF) et le facteur de croissance transformant bêta 1 (TGFβ1). L'ajout de ces facteurs aux constructions de dents issues de la bio-ingénierie peut donc être utilisé en combinaison pour améliorer la différenciation des cellules et la formation de tissus et de dents entières. (Smith & Yelick, 2016)

Une taille, une forme et un volume de pores adéquats sont souhaitables dans l'échafaudage. De même, l'aspect de la surface et sa porosité ont leur importance, que ce soit sous forme de mousse, d'éponge, de gel ou d'hydrogel. Tout ceci doit permettre la pénétration et la diffusion de cellules et/ou de facteurs de croissance et de nutriments au sein de la matrice, ainsi que l'évacuation de déchets cellulaires. (Sharma & al, 2014)

Les agents biologiques peuvent être adsorbés sur l'échafaudage par micro-pipetage et perfusion dans les micro-canaux. (Jamal, 2016) On peut également recourir aux nanotechnologies par le biais véhicules tels que des billes d'agarose, des billes d'alginates, une éponge de collagène, une membrane de collagène ou des microsphères d'hydrogels. Ils permettent une libération progressive et contrôlée. (Sharma et al, 2014) On peut également utiliser les électrolytes qui font preuve d'une faible toxicité et permettent une libération de principes actifs sur la durée tels des nano-réservoirs au contact des cellules. (Bécavin, 2015)

2.1.2 Implantation

Les techniques d'implantation peuvent varier en fonction de l'intervenant, mais on peut citer quelques principes généraux.

Le sujet est d'abord anesthésié, et la cavité buccale est désinfectée à la chlorhexidine.

La transplantation doit se faire dans une zone qui a préalablement été édentée. Dans les études expérimentales, l'intervenant procède à l'extraction de la dent à remplacer, souvent dans la même fenêtre chirurgicale que l'implantation. Le site est ensuite irrigué à la solution saline qui permet de maintenir une vascularisation de la zone. Dans la perspective d'application clinique future, si l'extraction est plus ancienne il peut être nécessaire de procéder à un préforage de l'os alvéolaire.

La muqueuse gingivale est incisée au sommet de la crête et le décollement se fait en pleine épaisseur exposant le pan vestibulaire de l'os. On peut faire des incisions de décharges pour soulager la tension.

Avant d'implanter le dispositif, on doit s'assurer radiologiquement de la vacuité de l'alvéole. Celle-ci peut être aménagée et adaptée aux dimensions de l'implant.

L'implant est placé dans l'alvéole vide et la muqueuse gingivale est remise en place par points simples. (Yang & al, 2016)

2.1.3 Croissance et maturation

Après l'implantation, le transplant est ménagé à la fois au niveau des contraintes occlusales que de l'alimentation.

Par exemple, dans l'expérimentation de Dualibi en 2008, les rats ne seront sustentés que de nourriture molle pendant 12 semaines le temps que l'implant croisse. Une fois en place, la dent créée doit se positionner en occlusion avec les dents antagonistes jusqu'à obtenir un bon équilibre. Yang & al. en 2015 ont, eux, suivi de près la prise de

poids régulière des cochons nains afin de contrôler la fonctionnalité de la dent bio-générée.

2.2 Expérimentations sur l'animal

On peut citer quelques-unes des expérimentations majeures qui ont permis d'avancer dans ce sens.

- En 2006, Honda & al. ont prélevé des cellules du bourgeon dentaire d'un chien, les ont ensemencées sur un échafaudage de type éponge collagénique et transplanté sur une zone édentée. Ils ont pu observer la régénération de dentine mais pas d'émail ou de racine.

- En 2007, Kuo & al. ont extrait des cellules ex-vivo au stade cloche sur le porc, puis les ont cultivées sur une matrice cylindrique puis remis en place dans l'alvéole. Ils ont pu obtenir la formation d'une dent avec structure radiculaire et parodonte mais de taille anormale, les racines ne sont pas régulières et il n'y a pas d'éruption complète et de mise en occlusion fonctionnelle

- Dualibi & al. en 2008 ont utilisé une matrice de PGA/PLLA en forme de dent

- Sonoyama & al. ont, eux, expérimenté la « dent hybride » en 2006

- Plus récemment, Yang & al. ont développé une dent à partir d'une matrice cylindrique en 2015

2.2.1 Exemple de la matrice tridimensionnelle de forme dentaire

Dualibi & al. ont expérimenté cette technique en 2008 selon le protocole suivant :

- Matériel et méthodes

- Les rats sont pris pour sujet

- On utilise une matrice polymérique de polyglucolate/poly-L-lactate (PGA/PLLA)/poly-L-lactate-coglucolate de taille uniformisée, traitée et stérilisée créé à partir d'un moule de dent
- Le bourgeon dentaire est extrait puis réduit en morceaux. Ceux-ci sont ensuite digérés par des enzymes de type collagénases/dispases et cultivés *in vitro*

- L'implantation se fait dans la mandibule et en parallèle dans l'épiploon. On implante également une matrice non activée comme témoin.

- La zone d'extraction de la dent (M1) et de l'implantation est désinfectée à la chlorhexidine et la vascularisation est maintenue. L'incision de 3 mm s'étend de la face mésiale de la troisième molaire à la zone mésiale la première molaire.

- L'implantation est faite et la muqueuse gingivale est replacée à l'aide de points simples de suture avec un fil 5.0.

- Les rats sont nourris avec de la nourriture en poudre pendant une semaine et on laisse croitre les implants pendant 12 semaines.

On peut donc citer les groupes de contrôle suivants : 7 souris témoins, 5 matrices PGA/PLLA inactivés et 5 PGLA inactivés.

Les rats sont sacrifiés, les hémi-mandibules sont prélevées et on procède à :

- Des analyses radiologiques
- Des analyses histologiques : après fixation au formalin
- Des analyses immunohistochimiques : comparées aux dents naturelles du rat (Figure 36)

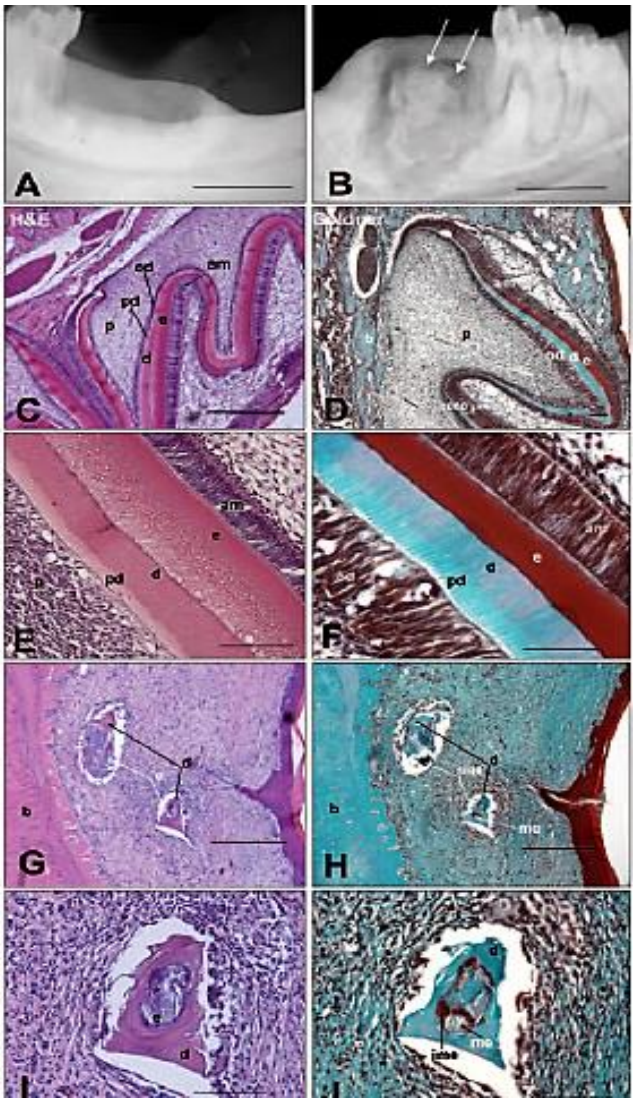

Figure 36 : Analyse radiographique et histologique d'implants expérimentaux et témoins récoltés et sectionnés sur 12 semaines. (**A**) Site de l'implant de contrôle négatif. (**B**) Les zones radio-opaques localisées (flèches) indiquent la formation de tissu minéralisé après implantation du dispositif ensemencé de cellules. (**C**, **E**) Les bourgeons dentaires implantés avec contrôle positif teinté à l'hématoxyline-Eosine (H & E) présentaient des structures dentaires bien formées, organisées en couronne et en racine. (**D**, **F**) Les implants de bourgeon dentaire colorés à la solution de Goldner ont révélé une dentine teintée de bleu caractéristique et un émail immature teinté de brun. (**G**, **I**) Les tissus dentaires issus de la bio-ingénierie et colorés par H & E présents dans les implants de mâchoire. (**H**, **J**) Les sections colorées de Goldner ont révélé une dentine teintée de bleu, un émail immature teinté de brun et des tissus d'émail. Les échafaudages témoins non ensemencés ne formaient pas de tissus dentaires (données non présentées). Les 16 implants expérimentaux à ensemencement cellulaire et les 14 bourgeons dentaires de contrôle implantés ont produit des tissus dentaires radio-opaques. Aucun des échafaudages non ensemencés de contrôle négatif n'a produit de tissu minéralisé radio-opaque. Echelle : 100 µm. (Source : Dualibi & al, 2008)

- Conclusions de l’étude

- Conclusions de l’analyse radiographique :

On observe la présence de tissus minéralisés dans les matrices de PGLA et PGA/PLLA (à la différence des témoins négatifs)

D’autre part, on observe la présence de zones radioclaires inflammatoires autour de l’implant

De petits odontoïdes très différents d’une dent naturelle sont obtenus.

- Conclusions de l’analyse histologique :

On observe sur les matrices positives des tissus minéralisés tels que de la pré-dentine, de la dentine et de l’émail non minéralisés (toujours en opposition aux témoins négatifs).

- Conclusions de l’analyse histochimique :

Le taux de concentration enzymatique lors de la digestion cellulaire doit être établi avec précision. En effet, si elle est trop faible, l’action n’est pas optimisée tandis qu’au-delà d’un certain seuil le pH devient trop élevé.

D’autre part, on observe la présence de protéines de la dentine, de l’émail et du ligament parodontal.

On constate à peu près les mêmes résultats dans la mandibule que dans l’épiploon même si la « dent » semble plus minéralisée et mieux organisée dans l’épiploon ; peut-être que l’aménagement et le nettoyage de la zone d’implantation mandibulaire ont atténué l’inflammation ce qui a pu freiner la croissance.

Une matrice différente avec une topographie différente pourrait produire une dent plus grande et plus fonctionnelle grâce à l’interaction et le potentiel de dégradation des cellules.

2.2.2 Exemple de la « dent hybride »

Cette technique a été mise en œuvre par l'équipe de Sonoyama en 2006. Elle peut apparaître comme une approche plus réaliste puisqu'elle implique la régénération d'une racine uniquement.

L'expérimentation est pratiquée sur le cochon nain âgé de 18 mois et a pour principe d'associer une racine biologique d'incisive régénérée à une couronne artificielle (ou un bridge) en céramique. Le but est de pallier le défaut de minéralisation de l'émail des autres études ainsi que les problèmes d'anatomie coronaire.

- Description

La racine bio-générée est créée par injection de cellules souches (SCAPs/PDLSCs) sur un échafaudage tridimensionnel qui est ensuite implanté dans la mâchoire

Ce protocole est doublement hybride :

- il combine des cellules souches d'origine humaine, implantées dans l'alvéole d'un cochon ;
- il associe une racine biologique et une couronne prothétique.

- Mise en œuvre (Figure 37)

- On prélève des cellules souches de la papille dentaire (SCAPs) ainsi que des cellules du ligament dentaire (PDLSCs) humaines à partir de dents de sagesse extraites chez de jeunes adultes. L'utilisation de cellules SCAPs/PDLSCs permet de générer avec efficacité la construction d'un complexe tissulaire parodontal/racine, de permettre à la racine une bonne intégration dans l'os avec un ligament alvéolo-dentaire fonctionnel. (Estrela & al, 2011)

- Elles sont ensuite ensemencées sur une structure de type HA/TCP de la forme d'une racine d'incisive mandibulaire.

- Les PDLSCs sont placées sur le gel qui recouvre la partie externe de la matrice puis le dispositif est implanté dans la mandibule du porc à la place de l'incisive extraite.

- La cicatrisation dure trois mois. Après cela, le site est découvert (comme pour la mise en fonction d'un implant), on intègre un tenon/inlay-core et une couronne en céramique est scellée.

- Après quelques mois, les études radiologiques et histologiques confirment la présence de tissus minéralisés : on a une racine dentaire avec de la dentine et du cément ainsi que la présence d'un ligament parodontal qui permet une relation naturelle avec l'environnement. (Ikeda & Tsuji, 2008 ; Huang & al, 2009 ; Sari, 2014)

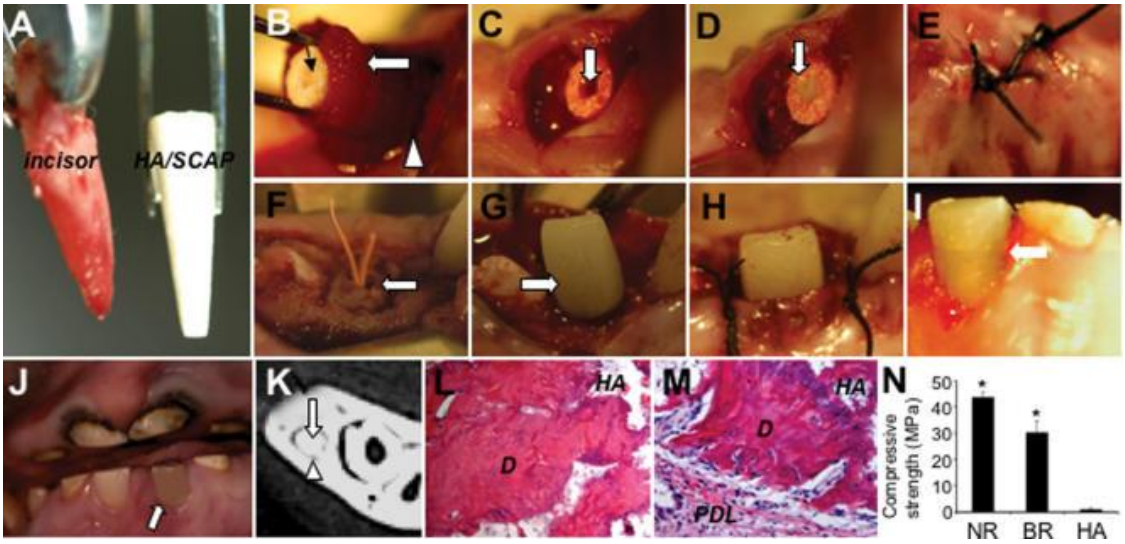

Figure 37 : L'ingénierie bio-radiculaire médiée par SCAPs/PDLSCs. **A** : une incisive mandibulaire extraite de porc et un échafaudage radiculaire en HA/TCP chargé avec des cellules de SCAPs. **B** : la matrice radiculaire recouverte de gel/mousse contenant des PDLSCs est implantée dans l'alvéole de l'incisive mandibulaire extraite (flèche). **C** : une fois implantée, un canal a été précréé dans l'ensemble matriciel (flèche). **D** : le canal radiculaire créé est obturé temporairement pour permettre le futur scellement de la couronne. **E** : l'implant est recouvert et la muqueuse est suturée **F** : trois mois plus tard, le canal est ré-exposé et l'obturation temporaire est retirée **G** : la couronne artificielle est scellée sur la racine. **H** : la section exposée est suturée. **I**,**J** : quatre semaines après, la couronne s'est mise en place pour remplir son rôle normalement. **K** : après trois mois d'implantation, l'implant HA/TCP/SCAP/Gel/PDLSC a formé une structure dure minéralisée que l'on peut observer ici à la coupe radiologique. **L**,**M** : on observe que le complexe a donné une structure de type dentine ainsi que des tissus de ligament parodontal. **N** : la mesure de la force compressive révèle que la racine générée a une résistance supérieure au support HA/TCP d'origine mais inférieure à la racine naturelle d'un cochon. (Source : Ikeda & Tsuji, 2008)

2.2.3 Exemple de la matrice cylindrique

En 2015, Yang & al. ont voulu mettre en évidence la possibilité de régénérer une dent de morphologie acceptable à partir d'un échafaudage tri-dimensionnel cylindrique. (Figure 38)

L'étude se fait sur des cochons nains de 18 mois :

- sous anesthésie générale, l'incisive centrale, la canine, la première prémolaire et la première molaire supérieures gauches sont prélevées ;

- les tissus périphériques sont retirés pour éviter la contamination des cellules à récolter. Les dents sont découpées pour exposer la pulpe et la prélever de façon aseptisée ;

- les tissus prélevés subissent ensuite la digestion enzymatique des collagénases puis les DPSCs sont mises en culture jusqu'à ce qu'elles se différencient en odontoblastes et ostéoblastes. La culture se prolonge pendant 18 jours ;

- en parallèle, du tissu épithélial est prélevé à partir de la muqueuse gingivale disséquée sur le porc, puis coupé et digéré par les collagénases. Les cellules sont également récupérées et mises en culture ;

- par ailleurs, un échafaudage bioactif est préparé à partir de gélatine, de chondroïdine et de hualuronane de forme cylindrique. Les cellules épithéliales, les odontoblastes et ostéoblastes obtenus sont recollectés et ensemencés sur l'échafaudage stérilisé sur les différentes couches des parties supérieure et inférieure de la matrice ;

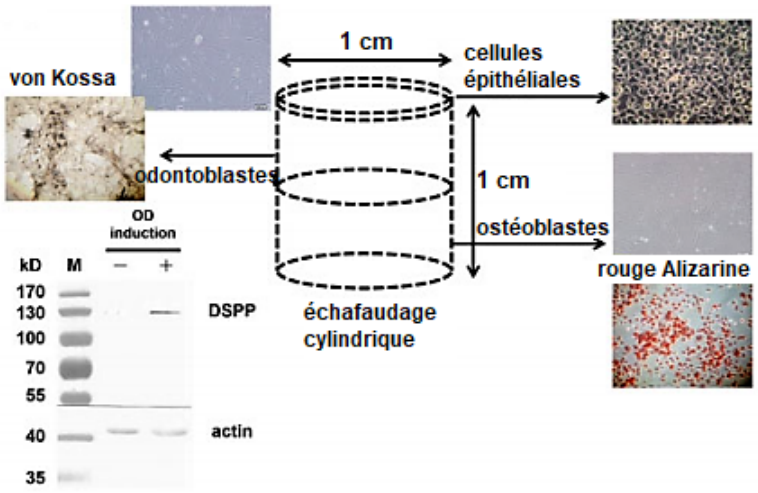

Figure 38 : Représentation schématique de la construction cellules/échafaudages en couches. Les odontoblastes différenciés des DPSCs sont positifs à la coloration de von Kossa, tandis que les ostéoblastes dérivés des DPSCs sont positifs à la coloration au rouge Alizarine. Les cellules épithéliales, les odontoblastes et les ostéoblastes sont ensemencés sur les couches superficielle, supérieure et inférieure de l'échafaudage cylindrique. (Source : Yang & al, 2016)

- sur les cochons nains, la muqueuse est incisée puis décollée en épaisseur totale au sommet de la crête, les germes dentaires sont extraits de la première à la deuxième molaire mandibulaire des deux côtés et les matrices sont implantées dans les alvéoles bilatéralement ;

- on assiste au développement d'une molaire de croissance correcte avec une couronne, une racine, un tissu pulpaire, de l'os alvéolaire et un ligament alvéolo-dentaire.

Cette étude montre que malgré l'utilisation d'une matrice cylindrique, une morphologie de molaire correcte est obtenue.

De plus, les dents générées sont exclusivement des molaires, alors que les cellules proviennent de plusieurs types de dents. Une théorie suggère que la morphologie des dents est en grande partie déterminée par la zone de la papille dentaire. On pourrait donc imaginer qu'avant l'origine des cellules c'est surtout la localisation de l'implantation qui induit la détermination de l'identité et de la morphologie dentaire.

Cette dernière doit pouvoir être influencée par l'adjonction de facteurs biologiques au dispositif de culture.

L'étude suggère donc que l'utilisation d'un échafaudage de la morphologie de la dent n'est pas primordiale pour régénérer une dent par bio-ingénierie. L'utilité même de l'emploi d'une matrice tri-dimensionnelle *in- vivo* est remise en question. (Yang & al, 2016)

Au cours des deux dernières décennies, la technologie de l'ingénierie tissulaire a évolué des attentes irréalistes aux applications cliniques sur des bases scientifiques solides. L'ingénierie tissulaire était basée sur l'idée de placer un échafaudage biodégradable préfabriqué chargé de cellules souches/progénitrices de l'organe ou de tissu spécifique pour produire un nouvel organe ou tissu. Un doute est cependant émis sur l'utilité de l'échafaudage *in vivo* dans l'amélioration du potentiel de réussite du procédé.

Bien que la méthode de l'échafaudage soit pratique pour le contrôle de la forme et de la taille des dents, elle présente des limites essentielles, notamment la fréquence de formation des dents et la réplication optimale des structures du tissu dentaire.

En effet, la formation du complexe émail-dentine émane des arrangements appropriés des lignées de cellules améloblastiques et odontoblastiques. Ils sont obtenus par des interactions épithélio-mésenchymateuses inspirées du développement naturel des dents. (Nakajima & al, 2014)

La matrice risque d'interférer dans ces interactions au niveau de la jonction épithélio-mésenchymateuse ou de perturber le gradient de différenciation des odontoblastes et des améloblastes.

Ainsi pour régénérer l'organe dentaire, les matrices ont assez rapidement été mises de côté. Les techniques de régénération s'en trouvent finalement simplifiées par rapport aux approches initiales.

3. Méthode d’agrégation cellulaire

La méthode d’agrégation cellulaire repose sur le principe de dissociation et de réassociation de cellules dans des milieux solides ou semi-solides sans utiliser d’échafaudage tri-dimensionnel.

Cette approche met en œuvre un protocole qui vise à reconstituer un germe d'organe, un « organoïde » issu de la bio-ingénierie qui reproduit correctement les interactions épithélio-mésenchymateuses et l'organogenèse. La transplantation d'agrégats de cellules bio-régénérées utilisant des follicules pileux et des cellules souches dérivées de la glande mammaire s'est révélée prometteuse pour la régénération de structures d'organes fonctionnels.

Les germes dentaires construits à partir de précipités de cellules épithéliales et mésenchymateuses dentaires par centrifugation cellulaire peuvent permettre l’édification complète de la dent.

La méthode d’agrégats cellulaires qui a donné les résultats les plus prometteurs actuellement est la Méthode Germe d’Organe. Celle-ci permet d’obtenir une réplication précise à haute densité des processus associés à l’organogenèse et suit un protocole scrupuleux. Elle vise à reconstruire un organe à travers la mise au point d’un germe fonctionnel qui va entamer son développement et engendrer un organe (ici une dent).

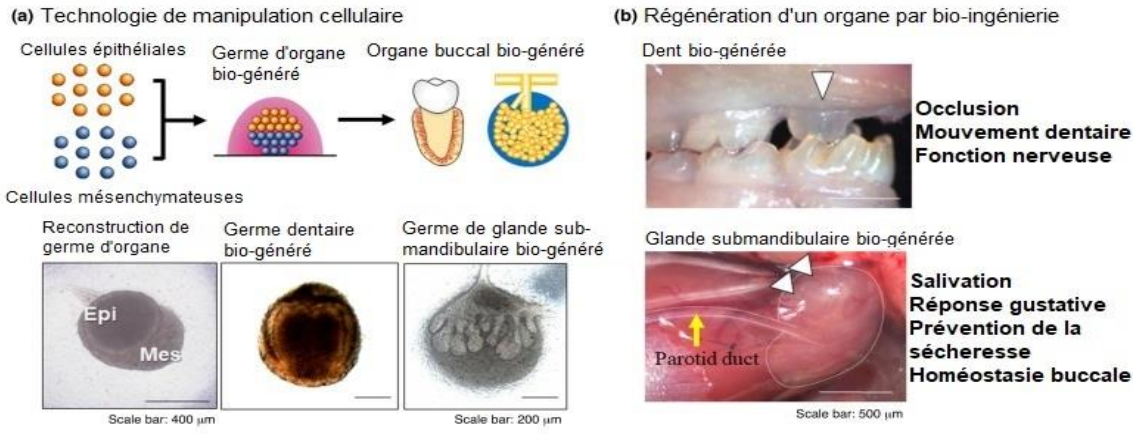

Figure 39 : Remplacement fonctionnel d'organes buccaux par la méthode du germe d'organe généré in vitro. (Source : Oshima & al, 2017)

(a) Les germes d'organes issus du génie tissulaire sont reconstruits en utilisant un compartimentage cellulaire approprié et des conditions de densité cellulaire élevée dans un gel de collagène en utilisant un germe dentaire ou des cellules épithéliales et mésenchymateuses dérivées d'un germe de glande submaxillaire. (b) Le germe de dent transplanté issu de la bio-ingénierie a pu se développer et atteindre le plan occlusal avec la première molaire inférieure. Le germe transplanté de glandes sous-maxillaires bio-généré pourrait être développé et greffé dans la région de la glande parotide. Ces organes buccaux modifiés par génie tissulaire pourraient restaurer complètement les fonctions respectives des organes. (Oshima & al, 2017)

3.1 Principes de mise en œuvre

3.1.1 Culture *in vitro*

Les méthodes d'agrégation cellulaire diffèrent énormément par les outils mis en œuvre. Ainsi, après dissociation cellulaire et tissulaire des germes, différents types de réassociations sont possibles :

- Hétérotypiques ou homotypiques : en faisant varier la nature des tissus.

Les associations tissus-tissus impliquent l'association du tissu épithélial et du tissu mésenchymateux sur un milieu semi-solide. De même, pour les associations cellules-cellules à partir de cellules mésenchymateuses et épithéliales isolées mises en culture sur un milieu semi solide.

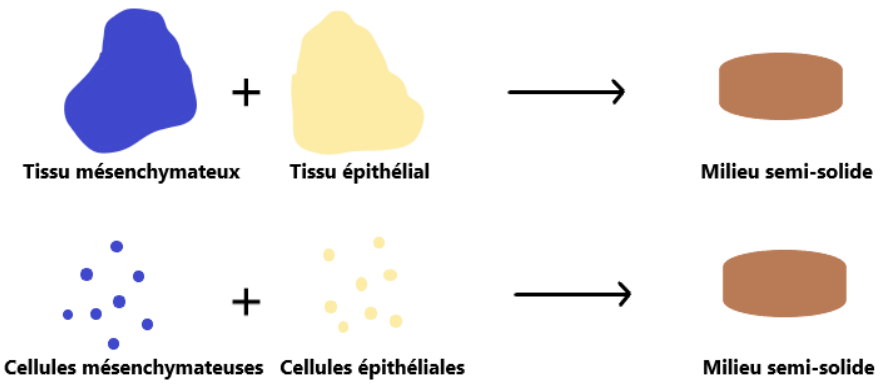

Figure 40 : La culture par réassociations homotypiques. (Source : Document personnel)

Les associations cellules-tissus permettent d'associer en milieu solide des cellules isolées cultivées en milieu liquide ou qui proviennent de la dissociation cellulaire du germe qui sont ensuite déposées sur un milieu semi solide en contact avec le tissu préservé. (Nakao & Tsuji, 2008)

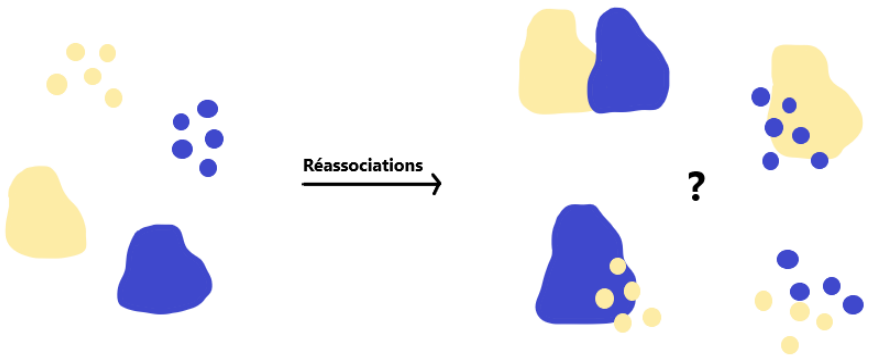

Figure 41 : Ensemble des recombinaisons possibles par culture hétérotypique. (Source : Document personnel)

Hu & al. ont, eux, effectué une même expérience à travers 3 combinaisons : l'association tissu mésenchymateux/cellules épithéliales, cellules mésenchymateuses/cellules épithéliales et tissu épithélial/cellules mésenchymateuses.

Ces expériences de dissociation–réassociation ont démontré que l'intégrité du mésenchyme est un paramètre important dans le contrôle de la morphogenèse coronaire. En effet, lorsqu'on utilise les cellules mésenchymateuses dissociées, la morphologie de la couronne est modifiée. Il est cependant compliqué en ingénierie tissulaire d'utiliser des tissus intacts ; ce défaut d'intégrité semble pouvoir être contourné par l'augmentation du nombre de cellules mésenchymateuses cultivées. (Hu & al, 2006)

- Hétérochrones ou homochrones : en faisant varier le stade embryonnaire des tissus :

La plupart des tissus est prélevée à partir de germes dentaires, puisque les cellules germinales restent celles ayant le plus gros potentiel régénératif. On utilise souvent des cellules prélevées embryologiquement au stade cloche ou capuchon (JE13,5 à

14,5). Cependant le grand intérêt aujourd'hui est d'obtenir le même résultat à partir de cellules prélevées sur l'adulte.

- Hétérotopiques et homotopiques : en faisant varier le site d'extraction des tissus.

De nombreuses réassociations ont été étudiées mais les meilleurs résultats viennent de la Méthode Germe d'Organe.

Le principe est de réassocier des cellules épithéliales et des cellules mésenchymateuses dans un milieu à très haute densité sur un gel de collagène de type I.

Pour créer le germe *in vitro*, on doit donc se procurer des cellules épithéliales ainsi que des cellules mésenchymateuses destinées à être réassociées. Le plus souvent on utilise des cellules dissociées obtenues à partir d'un germe (de souris ou autre) au stade cloche ou capuchon. Reconstituer un germe entier à partir de cellules adultes reste un challenge et constitue le défi de la future application clinique à l'Homme.

La culture des cellules se fait dans un milieu artificiel, donc de composition connue et sans variation due au métabolisme. Le plus souvent dans notre cas, le protocole implique une compartimentation des cellules mésenchymateuses et épithéliales à haute densité dans la matrice collagénique.

Les cultures à haute densité font référence à des densités cellulaires de l'ordre de 10^7 cellules par millilitre, de nos jours, on vise même une concentration de 150 millions de cellules par millilitre. Pour ce faire, l'utilisation de systèmes de bio-réacteur permet d'optimiser les densités de cellules. Celles-ci sont isolées, purifiées ce qui autorise l'obtention d'une qualité globale élevée du produit. (Ozturk, 1996 ; Schirmer, 2010)

L’agrégation des cellules et la formation du germe se font par auto-organisation de chaque type cellulaire. Ce sont les interactions réciproques des couches de cellules épithéliales et mésenchymateuses qui initient l’organogenèse et qui régule la différenciation et la morphogenèse.

Pendant la culture *in vitro*, la formation de la couronne dentaire va débuter. Après 8 jours, l’histogenèse épithéliale et la morphogenèse cuspidienne sont initiées, et la différenciation fonctionnelle des odontoblastes a débuté.

3.1.2 Implantation et éruption

L’implantation se fait sur le site d’extraction après avoir respecté un délai de cicatrisation (partielle ou complète) de l’os et de la muqueuse. Puis on procède à une incision de la muqueuse pour exposer l’os cicatrisé ou l’alvéole (comme pour un implant).

Il est parfois nécessaire en fonction de la technique, de procéder à un préforage de l’os alvéolaire afin d’aider l’implantation. Le gel de collagène entourant le germe est quant à lui retiré avant transplantation.

Il est très important de veiller à implanter le germe dans le bon sens afin de garantir la réussite de la procédure. L’utilisation de colorants permet de s’en assurer.

C’est à partir de la phase d’implantation qu’on observe une réassociation des cellules cultivées, la vascularisation se met en place, les améloblastes deviennent fonctionnels et la dentine, comme l’émail, se minéralisent. L’implantation entraîne également le début de la formation radiculaire.

Le développement se poursuit alors par le processus éruptif. Le gène CSF-1 qui permet la synthèse d’ostéoclastes pendant l’éruption ainsi que Pthr (récepteur de l’hormone parathyroïdienne) sont exprimés et régulent à eux deux l’activité ostéoclastique comme dans l’éruption d’une dent normale. Il y a donc un échange entre le follicule dentaire et le tissu osseux environnant. Tous ces paramètres permettent de reproduire le mécanisme d’éruption du germe de la dent naturelle. (Ikeda & al, 2009 ; Ikeda & Tsuji, 2009 ; Oshima & al, 2011 ; Sari, 2014)

3.2 Expérimentations sur l'animal

3.2.1 Régénération d'une molaire par Méthode Germe d'Organe

L'équipe d'E. Ikeda en 2009 s'appuya sur la culture cellulaire organotypique : l'objectif est de créer un germe dentaire de molaire qui est ensuite réimplanté chez la souris adulte. (Figure 42)

Le protocole mis en place est le suivant :

- Préparation de l'implant

- Les germes dentaires sur la souris donneuse au stade de bourgeon à JE14,5 sont prélevés ;
- les tissus et les cellules sont soumises à une dissociation enzymatique ;
- les cellules épithéliales et mésenchymateuses recueillies sont ensuite mises en culture pendant une semaine puis le germe est reconstitué dans une matrice collagénique.

- Manipulation du sujet cible

- la première molaire maxillaire de la souris âgée de 5 semaines est extraite sous anesthésie générale ;

- la cicatrisation de l'alvéole dentaire et de l'épithélium oral est surveillée pendant 3 semaines ;

- l'opérateur doit s'assurer de la vacuité de l'alvéole avant transplantation par analyse radiographique ;

- la muqueuse buccale est incisée avec des ciseaux fins sur 1,5 mm au niveau du site extractionnel pour accéder à l'os alvéolaire ;

- l'utilisation des forets fins est envisageable afin de recréer un trou osseux de 0,5 à 1 mm de diamètre ;

- le germe est retiré du collagène la transplantation. Il faut s'assurer de marquer

le sommet de l'épithélium dentaire avec un colorant comme le bleu de méthylène qui assure la bonne orientation de l'implant ;

- la muqueuse buccale est ensuite suturée avec du fil nylon 8.0 et le site est désinfecté ;

- les souris sont nourries avec de la nourriture en poudre ou liquide jusqu'à l'éruption de la dent ;

- après 36,5±5,5 jours on assiste à l'éruption de la dent dans la cavité buccale et à l'exposition de la première cuspide ; puis à 49 jours après implantation la dent est en occlusion. (Ikeda & Tsuji, 2008 ; Ikeda & al, 2009)

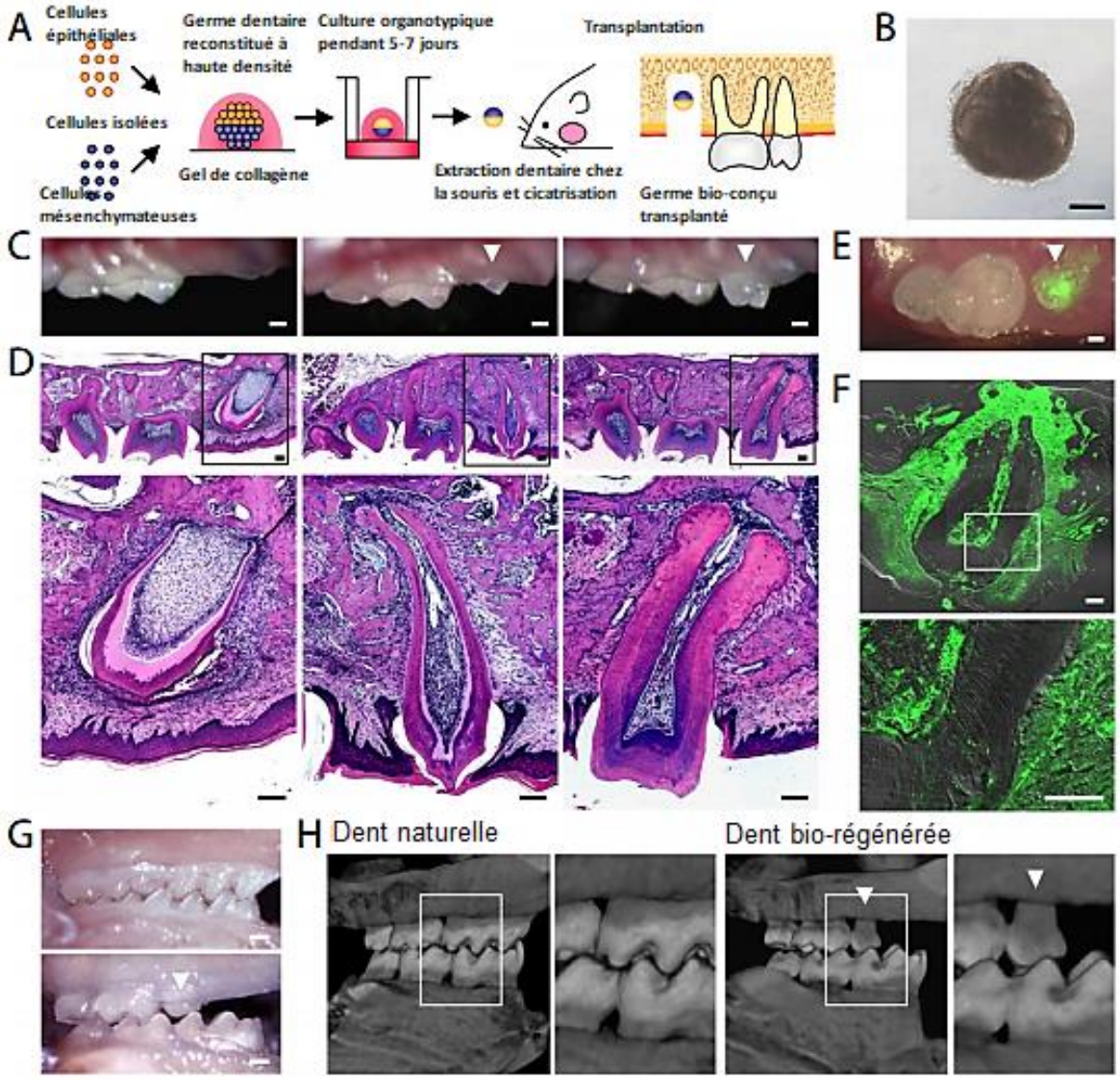

Figure 42 : Eruption et occlusion d'une dent par génie tissulaire. (Source : Ikeda & al, 2009)

A : Représentation schématique de la technologie de transplantation utilisée pour la génération de germe dentaire reconstitué. **B** : Image en contraste de phase d'un germe de dent généré par génie biologique au cinquième jour d'une culture d'organe. **C** : Photographies orales d'une dent bio-générée lors des processus d'éruption et d'occlusion, y compris avant l'éruption (à gauche), immédiatement après l'éruption (centre) et après occlusion complète (à droite). **D** : Analyse histologique de la dent créée par génie tissulaire au cours des processus d'éruption et d'occlusion, y compris avant l'éruption (à gauche), immédiatement après l'éruption (centre) et après occlusion complète (à droite). **E** : Photographie orale d'une dent reconstituée à l'aide d'une combinaison de cellules épithéliales de souris normales et de cellules mésenchymateuses de souris transgéniques marquées aux protéines fluorescentes GFP (Green Fluorescent Proteins). **F** : Image en coupe d'une dent bio-générée par GFP. **G** : Photographies orales montrant l'occlusion des dents normales (en haut) et issues de la bio-ingénierie (en bas). **H** : Images en MicroCT de l'occlusion des dents naturelles (gauche) et bio-générées (droite). (Ikeda & al, 2009)

3.2.2 Régénération d'une unité dentaire complète

L'équipe de Mashimutu Oshima a créé en 2011 une « unité dentaire fonctionnelle » *in vitro*. Cette unité est composée d'une dent mature, d'un ligament alvéolo-dentaire et d'os alvéolaire, qui sont réimplantés chez la souris.

Ils ont mis au point la méthode suivante :

- Conception du transplant

Le procédé consiste à prélever des germes de molaires de souris à JE14,5 au stade de cloche. Les cellules épithéliales et mésenchymateuses sont dissociées puis cultivées. Le germe est reconstitué à haute densité dans un support collagénique après culture pendant 5 à 7 jours.

Le germe est ensuite transplanté dans une capsule rénale de souris pendant 60 jours. On obtient une structure minéralisée, des ébauches de racines et du tissu parodontal grâce à une croissance normale.

Il est important de générer une unité dentaire de forme et de longueur contrôlées, de manière à obtenir une taille adaptée à la transplantation orale. Pour cela, le germe a été inséré dans un dispositif de contrôle de taille en forme d'anneau avant la transplantation surrénalienne. Ce dispositif permet d'éviter la pression exercée par la

membrane de la capsule rénale et de réserver un espace tridimensionnel au développement normal d'un germe de dent bio-généré.

La transplantation de plusieurs germes dentaires dans un seul dispositif de contrôle de la taille permet également de générer plusieurs unités dentaires entourées d'os alvéolaire. Chaque dent obtenue par ingénierie tissulaire avait une structure correcte, y compris une cavité pulpaire et des espaces parodontaux cloisonnés. Par conséquent, de multiples substitutions de dents peuvent être obtenues avec cette méthode de greffe régénérative. (Oshima & al, 2011)

- Phase d'implantation sur le sujet cible

La première molaire inférieure a préalablement été extraite chez la souris receveuse âgée de 4 semaines ; on laisse ensuite cicatriser la gencive pendant 4 à 6 jours. L'unité dentaire est finalement implantée dans l'os alvéolaire aménagé par un forage osseux dans un positionnement atteignant le plan d'occlusion avec la molaire antagoniste.

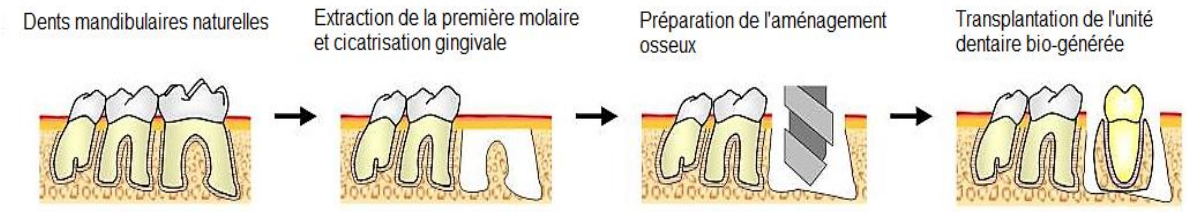

Figure 43 : Représentation schématique du protocole utilisé pour transplanter une unité de dent modifiée par génie tissulaire dans un modèle de perte de dent murine. (Source : Oshima & al, 2011)

Une cicatrisation osseuse partielle après 14 jours, puis totale après 30 jours est obtenue.

L'implantation de cette unité est idéale pour compenser un défaut osseux vertical, puisqu'elle permet de régénérer l'os en plus de la dent. Il peut s'agir d'une nouvelle approche dans le traitement des cas cliniques de perte de dent accompagnée d'un défaut alvéolaire osseux sévère.

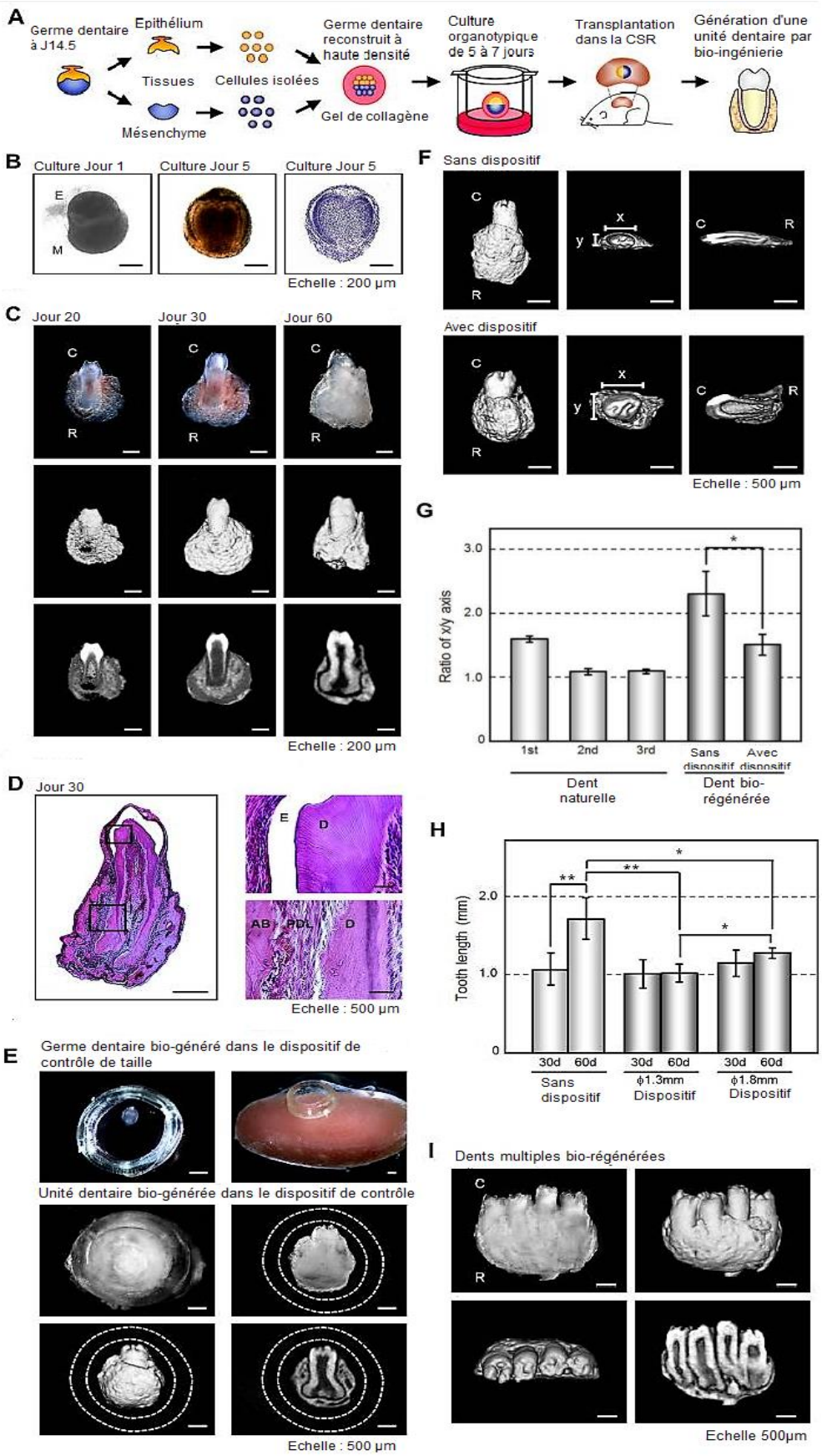

Figure 44 : Génération d'une unité dentaire par ingénierie tissulaire (Source : Oshima & al, 2011)

A : Représentation schématique de la technologie régénérative de l'unité dentaire. **B** : Imagerie de la phase de construction du germe. E, épithélium ; M, mésenchyme. **C** : Photographies (en haut) et images radiographiques de la surface externe (au centre) et de coupes transversales (en bas) d'une unité dentaire mise au point par bio-ingénierie à différents stades après transplantation dans la capsule rénale (SRC). C, partie coronaire ; R, partie radiculaire. **D** : Analyse histologique de l'unité dentaire bio-générée au jour 30 après la greffe dans la SRC (à gauche). Images de plus fort grossissement de la partie coronaire (en haut à droite) et du tissu parodontal (en bas à droite). E, émail ; D, dentine ; AB, os alvéolaire ; PDL, ligament parodontal. **E** : Photographies des processus de développement du germe bio-généré dans la SRC à l'aide d'un dispositif de contrôle de taille. Des images du germe orienté dans l'appareil (en haut à gauche), transplanté dans le SRC (en haut à droite).), et la dent bio-régénérée au bout de 50 à 60 jours après la transplantation dans le SRC (milieu). Images radiographiques de la surface externe (en bas à gauche) et de la coupe transversale (en bas à droite). Les lignes en pointillés indiquent les contours du dispositif. **F** : Images par tomodensitométrie d'une unité dentaire bio-générée transplantée dans la SRC pendant 30 jours avec (ligne inférieure) ou sans (ligne supérieure) le dispositif de contrôle de la taille en coupe latéral (gauche), axiale (centre) ou vue transversale (droite). **G** : ratios de la longueur x par rapport à la largeur y (x/y) des couronnes d'unités dentaires bio-générées à 30 jours après la transplantation dans la SRC, ainsi que des première, deuxième et troisième molaires naturelles de souris âgées de 9 semaines. Les transplantations ont été effectuées avec ou sans le dispositif de contrôle de la taille de 1,3 mm d'épaisseur. **H** : Les longueurs des unités dentaires générées par génie tissulaire à l'aide de dispositifs de contrôle de taille, qui avaient un diamètre intérieur de 1,3 mm ou 1,8 mm, 30 et 60 jours après la transplantation dans les SRC ont été comparés avec ou sans les dispositifs. **I** : Photographies (première figure en partant de la gauche) et images radiographiques de vues latérales (deuxième figure), axiales (troisième figure) et en coupe transversale (quatrième figure) d'une multitude d'unités de dentaires créées par bio-ingénierie dans lesquelles quatre dents étaient entourées d'os alvéolaire, après 60 jours de transplantation dans la SRC. (Oshima & al, 2011)

3.3 Origines des quelques échecs rencontrés

Il est possible de détecter rapidement si les réassociations ne donnent pas lieu à une dent. En effet, avant l'échec, différents types de cellules mésenchymateuses ont montré des ruptures locales dans la jonction épithélio-mésenchymateuse. Nous ne connaissons pas encore les marqueurs moléculaires requis qui nous permettraient d'obtenir cette information encore plus tôt.

Chaque technique d'ingénierie étudiée présente son lot d'échec. Pour cette raison, il apparaît nécessaire d'identifier les exigences requises afin d'optimiser la réussite du procédé.

3.3.1 Erreurs de protocole

De mauvaises décisions dans le choix des outils et leur mise en œuvre peuvent impacter la réussite de la manipulation.

Par exemple, la capacité des cellules dentaires mésenchymateuses à provoquer la formation dentaire diminue drastiquement lorsqu'elles sont prélevées à JE16 plutôt qu'à JE14 de l'embryogenèse ; et après JE18 le potentiel de régénération de la première molaire mandibulaire est perdu.

Le facteur en cause n'a toujours pas été identifié. Il peut s'agir d'une diminution du potentiel odontogénique des cellules mésenchymateuses. On pense également à une modification de l'hétérogénéité des cellules mésenchymateuses lors de l'odontogenèse ou à l'incapacité progressive des cellules mésenchymateuses à s'adapter à l'épithélium dentaire à partir de JE14 (notamment lorsque la différence de stade entre les deux tissus est accrue).

D'autre part, en ce qui concerne les solutions enzymatiques de dissociation cellulaire, la dispase est souvent employée pour dissoudre la membrane basale, tout comme la collagénase qui détruit la matrice collagénique.

Or même si l'on utilise les réactifs adaptés, chaque protocole exige que l'on étudie attentivement les températures et les temps de réaction appropriés car l'activité enzymatique décroit rapidement à basse température. Dans de nombreux cas, les cellules peuvent être en partie endommagées par l'activité enzymatique et peuvent libérer leur ADN. Celui-ci une fois relâché peut causer une agrégation cellulaire et empêcher les étapes suivantes de se dérouler comme prévu. Cette accumulation peut être anticipée par la présence de DNase I. (Oshima & al, 2011)

Enfin, le développement une dent par bio-ingénierie à partir d'interactions épithélio-mésenchymateuses nécessite de s'assurer qu'il y ait une surface de contact suffisante entre le tissu épithélial et le tissu mésenchymateux.

3.3.2 Erreurs de manipulation

Chaque manipulation est très délicate, précise et s'apparente à de la microchirurgie.

En effet, l'opérateur manipule des tissus et des cellules dont l'échelle de grandeur est de l'ordre du micromètre ou du nanomètre. La manipulation sur les souris doit se faire avec des instruments de taille réduite qu'il s'agisse des scalpels, des pinces, ou des fraises. De même, l'isolement des germes dentaires doit être opéré sous microscope à dissection.

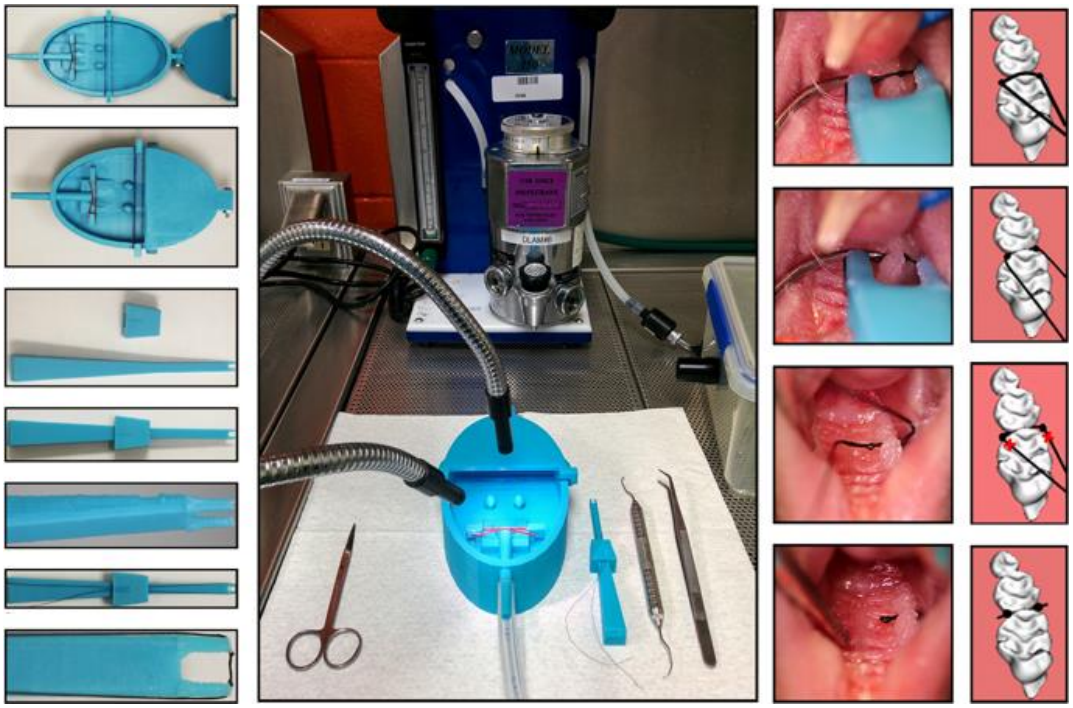

Figure 45 : Outils et dispositifs mis en œuvre dans les expérimentations chez la souris. (Source : Marchesan & al, 2018)

Certaines manipulations nécessitent la même minutie et les mêmes précautions chez l'Homme. Le prélèvement d'un nombre approprié de cellules implique par exemple l'utilisation de petites pipettes très précises.

Les instruments chirurgicaux doivent être nettoyés et stérilisés à l'autoclave à chaque utilisation pour éviter les contaminations. Quant au lavage cellulaire et tissulaire, il doit

s’appuyer sur l’utilisation d’une solution isotonique qui ne crée pas de lésions tissulaires.

La manipulation qui permet de régénérer un germe doit être réalisée rapidement puisque le gel de collagène se solidifie très vite avec le temps et semble sensible aux variations de température.

Enfin, il faut penser à bien adapter la taille de l’« alvéole » aménagée à la taille de l’unité dentaire générée. (Oshima & al, 2011)

- Problème d’orientation du germe

L’orientation du germe dans les études menées par Ikeda & al. est importante, elle est validée par marquage de la partie haute de l’épithélium au colorant. Le bleu de méthylène est utilisé comme colorant biocompatible dissout dans du gel d’agarose pour marquer le tissu épithélial de la dent reconstituée. Il permet donc de faciliter l’orientation du germe pendant la transplantation intra-buccale.

Dans le modèle actuel de transplantation, les implants non éruptifs sont survenus à une fréquence basse. Ils étaient imputables à certains phénomènes tels que la transplantation inversée ou le rejet implantaire. (Ikeda & al, 2009)

Le succès clinique de cette technique d’ingénierie tissulaire dépend également du contrôle des influences défavorables pendant la régénération. L’opérateur doit s’assurer de la gestion des événements inflammatoires chroniques, de la maîtrise des infections bactériennes et de la réduction des lésions tissulaires lors de toute intervention de chirurgie régénératrice. (Botelho & al, 2017)

4. Recherche de protocoles applicables à l'Homme

L'identification de sources de cellules appropriées est l'un des défis majeurs de la recherche et permettrait de se projeter sur une application clinique chez l'Homme.

La régénération de la dent créée par génie tissulaire peut être optimisée par l'utilisation du matériel cellulaire du patient. Par conséquent, les cellules souches somatiques isolées de patients, ainsi que les cellules souches adultes ou d'origine non dentaire, font l'objet de recherches approfondies afin de déterminer si elles peuvent être utilisées pour la régénération de dents entières. (Ikeda & Tsuji, 2008)

4.1 Régénération à partir de cellules autologues

Le moyen le plus réaliste de permettre une application à grande échelle sur l'Homme serait de pouvoir prélever directement sur le patient cible les tissus nécessaires à l'obtention de cellules autologues progénitrices.

En effet, en plus d'en faire des sources disponibles, à portée de l'intervenant, la transplantation autologue permet de protéger le receveur des problèmes de rejets immunologiques liés aux tissus ou aux organes greffés. L'utilisation de cellules souches prélevées chez le patient constitue actuellement le premier choix en matière de thérapies régénératives (y compris la greffe de cellules souches et l'ingénierie tissulaire).

En 2017, Ono et al. ont proposé de reconstituer un germe à partir de cellules prélevées et dissociées sur les germes de prémolaires permanentes de chien.

Certains germes, comme celui de troisième molaire, sont déjà utilisés en greffe autologue direct pour pallier l'absence ou la perte de molaires de dimensions similaires. Ici, le germe créé par génie tissulaire pourrait permettre d'optimiser la taille de la dent en régulant la longueur de contact des cellules épithéliales et des cellules mésenchymateuses, ce qui diversifie les possibilités d'application.

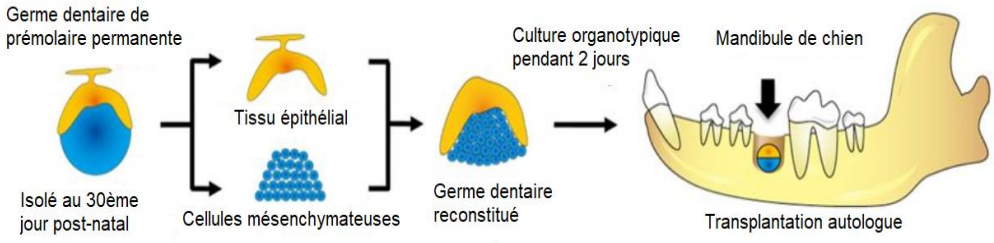

Figure 46 : Représentation schématique du protocole de Ono et al. Les germes de prémolaires de chien sont prélevés à J30 post natal, puis dissociés. On préserve le tissu épithélial qu'on associe aux cellules mésenchymateuses, puis après une mise en culture de 2 jours, le germe est réimplanté dans la mandibule du même chien. (Source : Ono & al, 2017)

Le processus de développement de la dent créée par bio-ingénierie après la transplantation était pratiquement identique à celui d'une dent naturelle. Des analyses micro-tomodensitométriques et histologiques ont révélé que la dent créée par génie tissulaire avait une racine unique et la structure spécifique du tissu dentaire composé d'émail, de dentine et de cément avec un ligament parodontal. Ces résultats ont indiqué que la reconstruction dentaire par ingénierie tissulaire à partir de germes dentaires permanents canins pourrait développer les structures dentaires appropriées après une greffe autologue dans la mandibule.

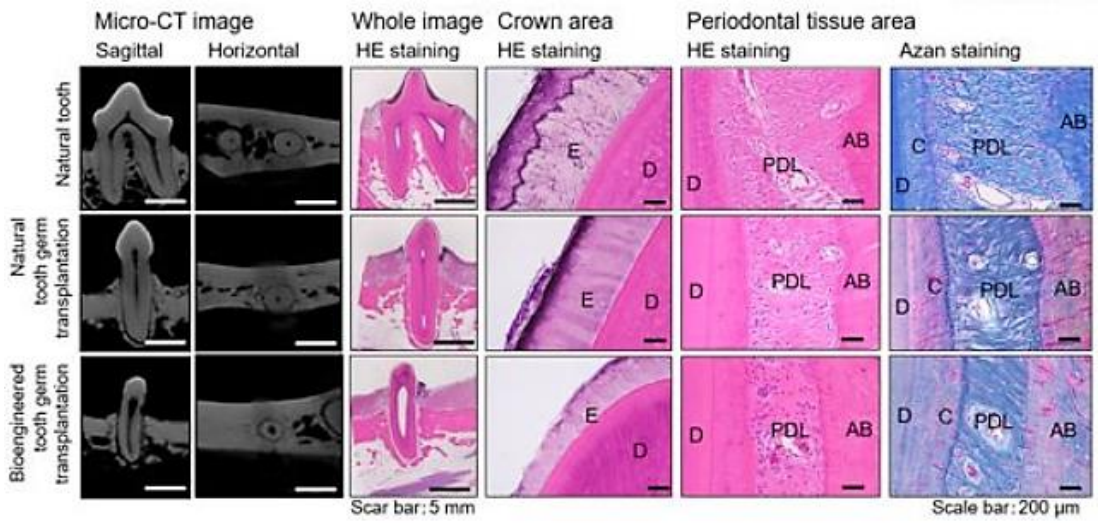

Figure 47 : Images par micro-tomographie et analyse histologique de la dent naturelle (en haut), de la transplantation de germe naturel (au milieu) et de la transplantation de germe par ingénierie biologique (en bas). Analyse histologique de la dent bio-générée au niveau de la couronne et des tissus parodontaux. (E) émail ; (D) dentine ; (C) du cément ; PDL, ligament parodontal ; (A, B) os alvéolaire. (Source : Ono & al, 2017)

Cette étude offre une nouvelle perspective chez le jeune adulte puisqu'on connait déjà une source autologue toute désignée à travers les germes des troisièmes molaires présents dès 7 ans. Les possibilités sur les personnes plus âgées sont, en opposition, limitées à ce niveau.

L'étude constitue un intérêt supplémentaire. En effet, on gagne en pertinence en basant la recherche sur un mammifère de grande taille. Ainsi, le protocole se rapproche un peu plus d'une éventuelle application sur l'Homme tant dans les dimensions que dans les délais de développement. (Ono & al, 2017)

4.2 Régénération dentaire à partir de cellules prélevées en période post-natale

Le but des expérimentations actuelles est de réussir à obtenir la régénération d'une dent en utilisant des cellules disponibles après la naissance, qui permettraient à terme une application plus aisée chez l'Homme.

Actuellement, les principaux défis de la régénération de la dent entière sont d'identifier les sources post-natales de cellules ayant les mêmes propriétés que les cellules germinales. On devra également développer des systèmes de culture capables de générer des cellules qui conservent le potentiel de formation de la dent. Ceci est compliqué par le fait que le développement des dents nécessite deux types de cellules, épithéliales et mésenchymateuses. (Angelova Volponi & al, 2017)

4.2.1 Régénération de la fraction mésenchymateuse

- A partir de la moelle osseuse

La première source évidente de cellules progénitrices de tissu mésenchymateux vers laquelle on se dirige est la moelle osseuse.

Pour reproduire la fraction mésenchymateuse, Ohazama en 2004, Hu en 2006 et Li en 2007 ont tous les trois utilisé la partie mésenchymateuse de la moelle osseuse. Ils ont démontré des facteurs communs entre ces cellules adultes et les cellules souches

adultes issues de la dent humaine. Ils ont aussi démontré qu'elles pouvaient sécréter des facteurs de croissance et des morphoprotéines utiles au développement dentaire ou à l'optimisation de la régénération du complexe épithélio-mésenchymateux. (Kuo & coll, 2011).

Li et coll en 2007 ont montré qu'il était possible de provoquer la différenciation des BMSCs en odontoblastes fonctionnels chez le rat en les cultivant et en les associant à des cellules épithéliales orales du JE11. On obtient la création d'une structure dentinaire fonctionnelle et la participation *in vivo* au développement de certains tissus tels que la couche odontoblastique de la pulpe dentaire, la dentine et le tissu parodontal au niveau des lésions de l'os alvéolaire.

Sharpe et al. en 2010 ont démontré que les cellules souches mésenchymateuses isolées de la moelle osseuse adulte sont capables de former des dents avec une morphologie coronaire standard. Les cellules stromales de moelle osseuse adultes peuvent former des dents *in vitro* lorsqu'elles sont combinées à un épithélium oral embryonnaire inductif.

Ces études témoignent de la capacité des sources de cellules mésenchymateuses d'origine non dentaires à réagir aux signaux épithéliaux odontogènes après une expansion *in vitro*. Ce résultat suggère que le mésenchyme dentaire embryonnaire peut être efficacement remplacé par des cellules souches adultes pour produire des dents.

- A partir du tissu adipeux

D'autres équipes se sont penchées sur la possibilité d'utiliser le tissu adipeux, puisqu'on sait qu'il possède un maintien de son potentiel de différenciation avec l'âge.

De plus ses cellules ont une grande capacité d'expansion *in vitro*, elles sont faciles d'accès et elles contiennent une grosse proportion de cellules mésenchymateuses. Elles ont un potentiel de différenciation en cellules osseuses, en cellules neuronales et en cellules endothéliales.

Ces cellules sont également capables d'exprimer les marqueurs de la minéralisation

odontoblastique ou améloblastique quand elles se trouvent dans un milieu odontogène sans biomatériau.

Hung et coll ont d'ailleurs montré en 2011 que si on implantait les ASCs à la place de l'incisive du lapin, elles ont les mêmes capacités de régénération dentaire que les DPSCs. (Keller, 2012)

- A partir des tissus nerveux

D'autres études en cours s'intéressent au cas des cellules souches neurales qui ont été utilisées comme une population de cellules souches multipotentes pures, mais qui ne sont pas encore connues pour leurs capacités à former des cellules dentaires.

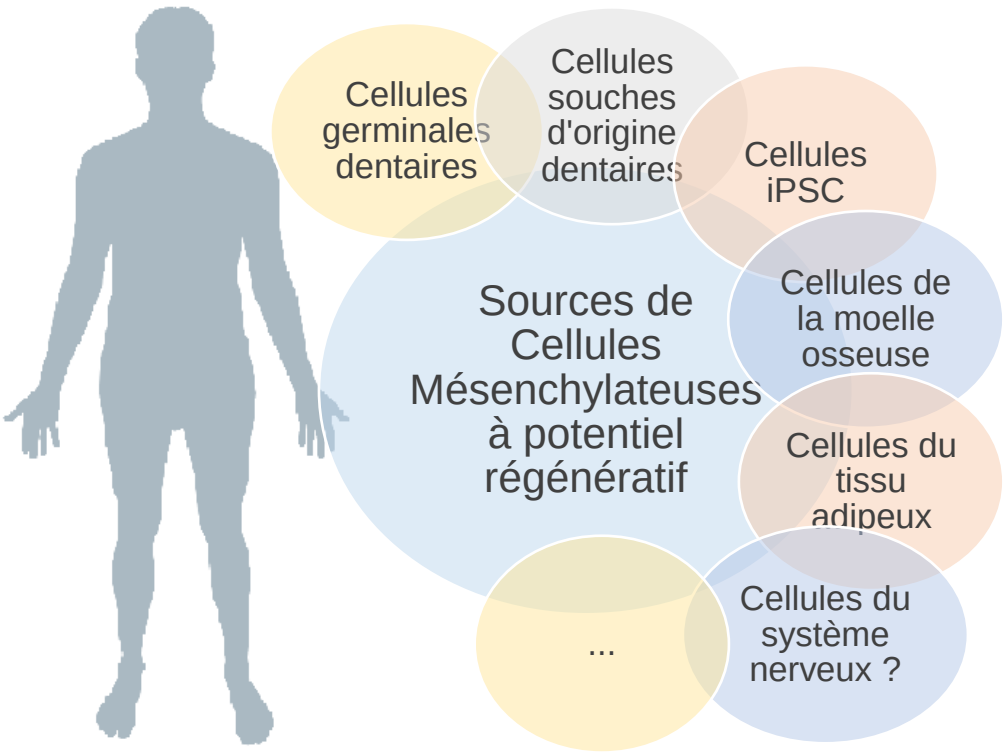

Figure 48 : Schéma récapitulatif des sources de cellules mésenchymateuses à potentiel régénératif (Source : Document personnel)

4.2.2 Régénération de la fraction épithéliale

Tous les tissus dentaires peuvent être générés à partir de cellules souches dentaires post-natales, sauf l'émail. En effet, celui-ci est formé d'adamantoblastes qui dérivent des cellules épithéliales dentaires d'origine ectodermique et qui disparaissent au cours de l'embryogenèse. La source principale de cellules épithéliales capables d'induire une odontogenèse est donc l'épithélium dentaire embryonnaire endogène au stade précoce ; le principal obstacle au fait de trouver d'autres sources exploitables est que celles-ci doivent conserver un état immature pour présenter un intérêt.

- A partir des restes épithéliaux de Malassez

Les restes épithéliaux de Malassez (REM) sont un groupe de cellules qui persistent durant la formation des racines : ces cellules sont donc présentes dans les dents adultes et peuvent être isolées et cultivées. Lorsque les cellules REM sont maintenues *in vitro* sur des couches nourricières, elles peuvent être induites pour former des tissus ressemblant à de l'émail après recombinaison avec des cellules pulpaires progénitrices.

- A partir de la muqueuse buccale

Les cellules épithéliales de la muqueuse buccale d'embryons et d'adultes ont depuis longtemps été étudiées dans des expériences de recombinaison et ont montré qu'elles donnaient lieu à des structures dentaires complexes, mais jusqu'ici on ne parvenait pas à obtenir des dents fonctionnelles entières. (Volponi & al, 2010)

Plus récemment, en 2013, Volponi & al. ont montré que les cellules épithéliales humaines adultes combinées à des cellules de mésenchyme germinal de souris développaient une structure semblable à de l'émail-dentine dans les capsules rénales de souris immunodéprimées. Ces études fournissent des preuves solides de la faisabilité de la régénération de l'épithélium oral à partir de sources de cellules non embryonnaires.

Pour cela, les tissus gingivaux ont été prélevés sur des patients au cours d'interventions de chirurgies buccales. Ils sont ensuite dissociés et la partie épithéliale est séparée de la partie conjonctive par action enzymatique.

Après 5 jours de culture, les cellules sont prélevées et adjointes sur la partie supérieure d'un tissu mésenchymateux prélevé sur une souris à JE14,5.

Après 7 jours de culture et une implantation dans la capsule rénale d'une souris immunodéprimée, on obtient à 6 semaines une reconstruction 3D avec des structures évidentes similaires à des dents. Une minéralisation de densité supérieure a été observée dans la partie coronaire de la structure obtenue, correspondant à l'émail de la couronne dentaire. Tandis qu'une minéralisation de densité inférieure correspondant à la zone de la dentine délimitait une chambre pulpaire et s'étendait jusque dans la partie radiculaire. (Angelova Volponi, 2013)

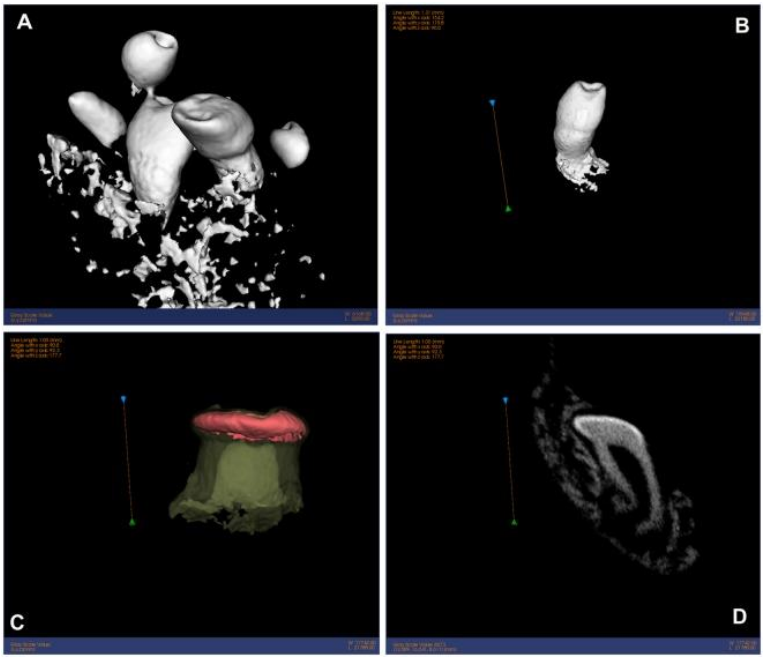

Figure 49 : Analyse MicroCT des tissus après développement. (A) recombinaisons épithélio-mésenchymateuses après 6 semaines de développement *in vivo* dans des capsules rénales. La formation de tissus durs est évidente et les reconstructions 3D montrent des structures multiples ressemblant à des dents. (B) Les dents présentent des couronnes et des racines bien développées. (C) Une minéralisation de densité supérieure peut être observée dans la partie coronaire (marquée en rose), correspondant à l'émail de la couronne de la dent. (D) Une image tomodensitométrique d'une région minéralisée coronaire visible avec une densité plus élevée, tandis qu'une minéralisation de densité inférieure correspondant à la zone de la dentine. (Source : Volponi, 2013)

- A partir de l'épiderme

Wang & coll. quant à eux, ont réussi en 2010 à reconstituer un organe chimérique à partir de cellules épithéliales non orales. En effet, ils ont utilisé des kératinocytes humains prélevés au niveau de l'épiderme chez des enfants de 5 à 12 ans. Ils les ont associées à un mésenchyme intact de molaire de souris à JE13,5 et implanté sur la souris immunodéficiente après 24h de culture avec le facteur de croissance FGF8. On obtient un taux de réussite de 25% avec obtention d'une dent chimérique homme/souris dont l'émail provient de la souris.

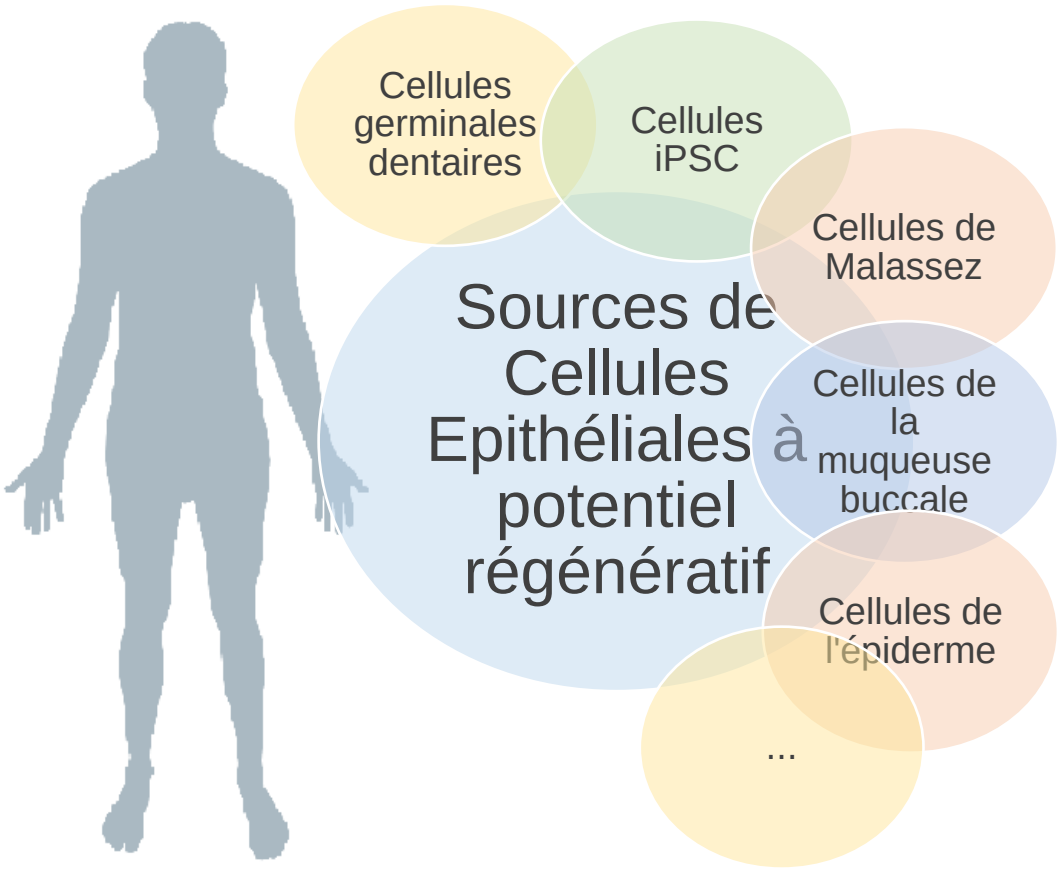

Figure 50 : Schéma récapitulatif des sources de cellules épithéliales à potentiel régénératif (Source : Document personnel)

On peut retenir de toutes ces études que lors du développement d'une dent par ingénierie tissulaire, de la même manière que lors de l'embryogenèse, une source de cellules conductives doit être combinée à une source de cellules répondantes. Et la

source de cellules mésenchymateuses, qu'elle soit inductrice ou réactive, doit être progénitrice/de type cellules souches.

Récemment, des sources de cellules iPSCs ont été identifiées, y compris plusieurs tissus buccaux tels que la pulpe, le ligament alvéolo-dentaire, la gencive et la muqueuse buccale. Ces cellules peuvent se différencier en cellules épithéliales et mésenchymateuses dentaires. (Ono & al, 2017)

4.2.3 Le cas des Cellules pluripotentes induites (iPSCs)

Dans le domaine de la dentisterie, les cellules iPSCs présentent une efficacité de reprogrammation et un taux de prolifération élevés. Elles peuvent dériver de cellules souches provenant de papilles apicales (SCAP), de cellules souches de pulpe dentaire (DPSC) et de cellules souches de dents déciduales exfoliées (SHED), des cellules souches de troisième molaire, des fibroblastes de la muqueuse buccale, des fibroblastes de la gencive et du ligament parodontal.

En 2014, Otsu & al. ont cherché à contrer les problèmes de disponibilité des cellules souches épithéliales dentaires chez l'adulte.

Pour cela, ils réussirent à obtenir des cellules iPSCs indifférenciées chez la souris à partir de cellules mésenchymateuses du germe dentaire. Puis les cellules iPSCs exprimant la protéine fluorescente DsRed ont été combinées au mésenchyme dentaire du stade JE14,5 et transplantées sur des éponges de collagène sous la capsule rénale de souris immunodéficientes. Quatre semaines après la transplantation, des structures germinales en forme de dents ont été observées dans des tératomes dérivés des cellules iPSCs ; et les cellules iPSCs ont exprimé un marqueur spécifique des améloblastes : l'amélogénine, ce qui indique que les cellules iPSCs se sont bien différenciées en adamantoblastes. (Figure 51)

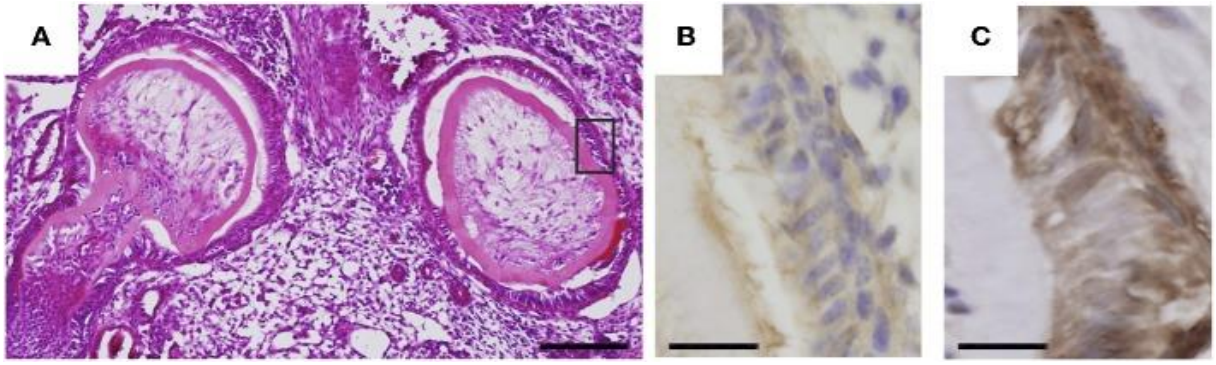

Figure 51 : Réponse odontogène de cellules iPSCs indifférenciées. Des cellules iPSCs exprimant DsRed ont été transplantées par voie sous-cutanée en même temps que des cellules mésenchymateuses de première molaire de souris à ED14.5. (A) Coloration HE (Hématoxyline-Eosine) montrant des structures semblables à des dents formées dans un tératome dérivé de cellules iPSCs. Echelle = 100 µm. (B) Immunomarquage pour DsRed dans la zone indiquée par un rectangle dans (A). Echelle=10µm. (C) Immunomarquage de l'amélogénine dans la section en série indiquée en (B). Echelle=10µm. (Source : Otsu & al, 2014)

Les résultats de ces expériences de transplantation ont cependant une reproductibilité médiocre (<10%) et le nombre de structures ressemblant à des germes dentaires dans les tératomes est réduit (<2 par tératome). Par conséquent, il est apparu que des signaux exogènes plus spécifiques et plus appropriés seraient nécessaires pour amener les cellules iPSCs non différenciées à acquérir des caractéristiques odontogènes.

Otsu & al. ont également montré qu'il était possible d'obtenir des iPSCs s'apparentant à des cellules de la crête neurale (Neural Crest-like Cells ou NCLC) à partir de cellules somatiques.

Puis la culture recombinante entre l'épithélium dentaire du stade JE14.5 et les NCLCs obtenues dans un gel de collagène a montré que les NCLC exprimaient le marqueur d'odontoblaste de la Sialoprotéine Dentinaire (DSP). En outre, après la transplantation dans la capsule rénale de souris immunodéficientes, des structures germinales en forme de dents calcifiée avec de l'os ont été obtenues, indiquant que les NCLC dérivées de cellules iPSCs ont la capacité de se différencier en odontoblastes via leur interaction réciproque avec l'épithélium dentaire.

Fait important, les NCLC n'ont pas provoqué de tératome lorsqu'elles ont été injectées par voie sous-cutanée avec un gel de collagène à des souris immunodéficientes. Ce résultat suggère que les NCLCs dérivées de cellules iPSCs peuvent résoudre le problème critique de la tumorigenèse dans l'application clinique de la greffe de cellules iPSCs *in vivo*.

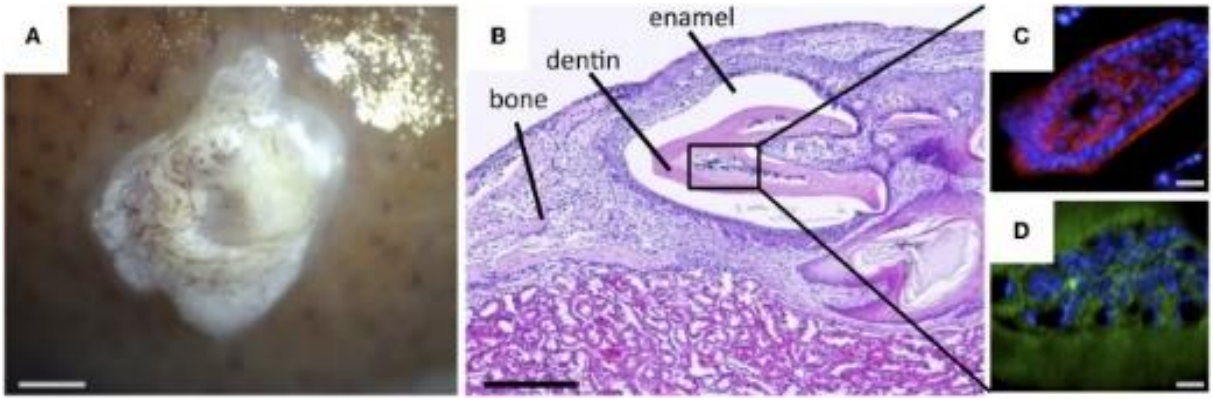

Figure 52 : Réponse odontogène des NCLCs dérivées de cellules iPSCs à l'épithélium dentaire. (A) Image montrant l'apparition du recombinant entre les NCLCs et l'épithélium dentaire deux semaines après la transplantation dans la SRC. Echelle = 500 µm. (B) Coupe histologique du recombinant présentant une structure semblable à une dent. Echelle = 200 µm. Les cellules à l'intérieur de la structure ressemblant à la dentine étaient positives pour les marqueurs d'odontoblastes DSP (C, Echelle = 10 µm) et nestin (D, Echelle = 25 µm). (Source : Otsu & al, 2014)

L'idée de générer les deux lignées nécessaires à la création d'un germe *in vitro* à partir de cellules iPSCs devient alors la solution de choix à explorer. (Figure 53)

En effet, le développement dentaire est contrôlé par des interactions réciproques entre les cellules mésenchymateuses dentaires dérivées de la crête neurales et les cellules épithéliales dentaires dérivées de l'épithélium ectodermique. Les interactions épithélio-mésenchymateuses contrôlent également la différenciation terminale des odontoblastes et des améloblastes. Ainsi, la stratégie d'approche actuelle dans la régénération dentaire revient à obtenir les cellules épithéliales et les cellules ectodermiques de la crête neurales induites à partir de cellules iPSCs et de faire naître les interactions épithélio-mésenchymateuses nécessaires au développement de l'organe dentaire.

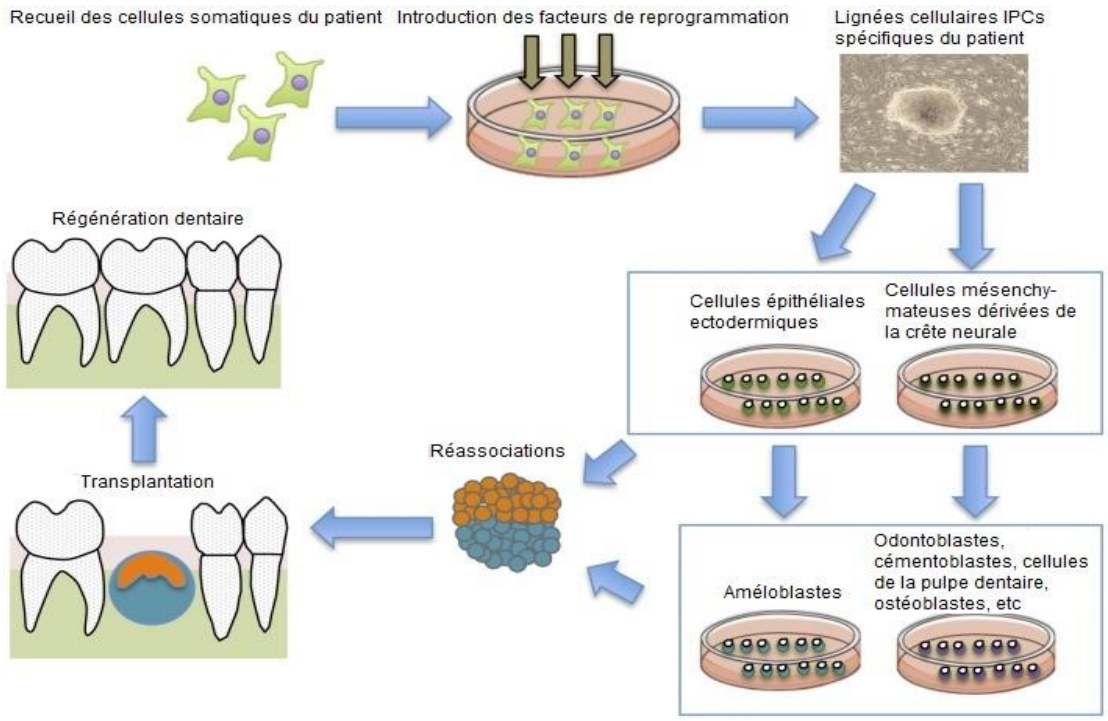

Figure 53 : Représentation schématique générale de la stratégie actuelle pour la régénération de la dent entière à l'aide de cellules iPSCs. Les cellules somatiques du patient sont récoltées. Des facteurs de reprogrammation sont introduits pour induire un auto-renouvellement et une pluripotence, et des cellules iPSCs spécifiques du patient sont générées. Les cellules iPSCs sont induites pour former des cellules épithéliales ectodermiques et des cellules mésenchymateuses dérivées de la crête neurale et sont ensuite induites pour former des cellules odontogènes in vitro. Les deux populations cellulaires sont combinées par contact direct, imitant la disposition in vivo. L'interaction de ces cellules conduit à la formation d'un germe dentaire précoce. Une fois transplantés en bouche, les recombinants se développent et permettent une récupération fonctionnelle après la perte des dents. (Source : Otsu & al, 2014)

Jusqu'ici, les cellules iPSCs ont permis de générer à la fois la fraction épithéliale et la fraction mésenchymateuse à partir de cellules somatiques dans des études distinctes. Reste à savoir quelles combinaisons permettront une application aisée chez l'Homme.

En effet, les études précédentes avaient démontré que selon le stade, l'épithélium dentaire ou le mésenchyme du germe dentaire a un potentiel inductif pour différencier aussi les cellules souches non dentaires en cellules odontogènes. Il pourrait être suffisant de générer une seule des deux lignées à partir de cellules iPSCs et de se procurer l'autre fraction parmi les cellules facilement accessible à l'âge adulte. (Malhebra, 2014)

Outre ces résultats, plusieurs rapports ont souligné le potentiel des cellules iPSCs pour la différenciation odontogénique.

La méthode de la goutte pendante sur un échafaudage de collagène de type I combiné à la protéine BMP-4 a induit des cellules iPSCs de souris pour former des cellules ressemblant à des odontoblastes et à des améloblastes sans recours aux interactions épithélio-mésenchymateuse. Ces résultats suggèrent fortement que la BMP-4 est une molécule clé pour la différenciation odontogénique des cellules iPSCs.

Les iPSCs générées à partir du facteur BMP-4 ont également démontré leur capacité à régénérer les tissus parodontaux, notamment le cément, le ligament parodontal et l'os alvéolaire. (Sunil, 2016)

Les cellules iPSCs constituent une alternative aux cellules souches embryonnaires sans aucun problème éthique et d'utilisation universelle. Ces cellules peuvent provenir d'une variété de cellules souches de tissus dentaires, telles que des cellules souches de papilles apicales, de la pulpe dentaire, des dents de lait, des troisièmes molaires, de la muqueuse buccale, de la gencive et du ligament parodontal.

Leur utilisation et leur application en dentisterie sont relativement récentes et continuent à faire l'objet de recherches. Les principaux défis et limites de la technologie des cellules iPSCs sont liés aux problèmes de mémoire épigénétique de l'ancien phénotype, à l'utilisation de rétrovirus, à la tumorigenèse, ainsi qu'à l'application de matériaux xénogéniques. (Malhebra, 2014) Il persiste également à ce jour, un important problème de coût qui limite encore la réalisation et le développement à grande échelle d'une telle approche.

PARTIE III : Résultats, perspectives et limites

A ce jour, les procédés élaborés par les études de la bio-ingénierie de l'organe dentaire sont très prometteurs.

Il reste cependant de nombreuses questions en suspens avant de pouvoir envisager des essais cliniques chez l'Homme.

Quels résultats sommes-nous en mesure d'espérer ? L'élaboration de protocoles acceptables sur les plans pratique et éthique pour l'Homme est-elle possible ? La démarche présente-t-elle un réel intérêt par rapport aux techniques déjà utilisées en clinique ? Permet-elle d'ouvrir la voie à d'autres projets d'ingénierie d'organes plus complexes ?

Dans cette troisième partie, nous exposerons les résultats obtenus ainsi que les perspectives et limites d'une éventuelle application clinique.

1 Résultats

L’organe dentaire joue un rôle essentiel dans les fonctions orales telles que la mastication, la digestion, la déglutition, l’élocution ainsi que l'esthétique faciale, qui influencent la qualité de vie de l’individu. Ces fonctions dentaires sont permises par les muscles masticateurs et l'articulation temporo-mandibulaire sous le contrôle du système nerveux central.

Afin d’assurer le succès de la thérapie régénérative de remplacement de la dent, celle-ci doit être développée à partir d’un germe ou d’une unité dentaire mature puis doit être greffée avec succès dans la zone d’édentement. Elle doit intégrer l’environnement buccal adulte et atteindre sa pleine fonctionnalité : une performance masticatoire suffisante, une coopération biologique avec les tissus parodontaux et une réponse afférente effective aux stimulations nocives dans la région maxillo-faciale. (Hirayama & al, 2013 ; Nakajima & al, 2014)

Le remplacement biologique a pour objectif premier la reformation de chacune des entités fonctionnelles de l’organe dentaire : les racines, le ligament parodontal, le réseau vasculaire et nerveux. Paradoxalement, la partie visible de la dent, la couronne, importe moins. En effet, bien que cette dernière soit l’effecteur direct de la fonction dentaire, son biomimétisme peut être parfaitement assuré par une couronne prothétique. (Volponi & al, 2010)

1.1 Réhabilitation des caractéristiques physiologiques de la dent

1.1.1 Morphologie

La régulation de la taille et de la forme des dents, à la fois pour la couronne et la racine, est un élément important à prendre en compte lors de la régénération d’une dent par ingénierie tissulaire. Les dents ont des caractéristiques morphologiques uniques propres à leur fonction et leur localisation sur l’arcade : les incisives, les canines, les prémolaires ou les molaires.

La localisation des germes lors du développement de la cavité buccale joue un rôle

prépondérant sur la définition des caractéristiques anatomiques des dents.

La morphologie résultante est le fruit d'une triade impliquant la fonction des dents, les muscles, ainsi que les articulations temporo-mandibulaires afin de maintenir une occlusion fonctionnelle. De cette morphologie résulte des standards esthétiques auxquels les patients sont attentifs et qui guide l'exercice du praticien. (Ikeda & al, 2009)

Les résultats d'études portant sur la morphologie de la dent générée par bio-ingénierie diffèrent en fonction des méthodes employées.

- Méthode des échafaudages tri-dimensionnels

Les premières équipes qui basaient leurs recherchent sur l'utilisation d'un échafaudage tri-dimensionnel de type PGA/PLLA, telles que Dualibi & al. ou Honda & al. obtenaient des résultats similaires.

Les analyses histologiques ont permis d'identifier la nature des tissus générés par cette approche de bio-ingénierie.

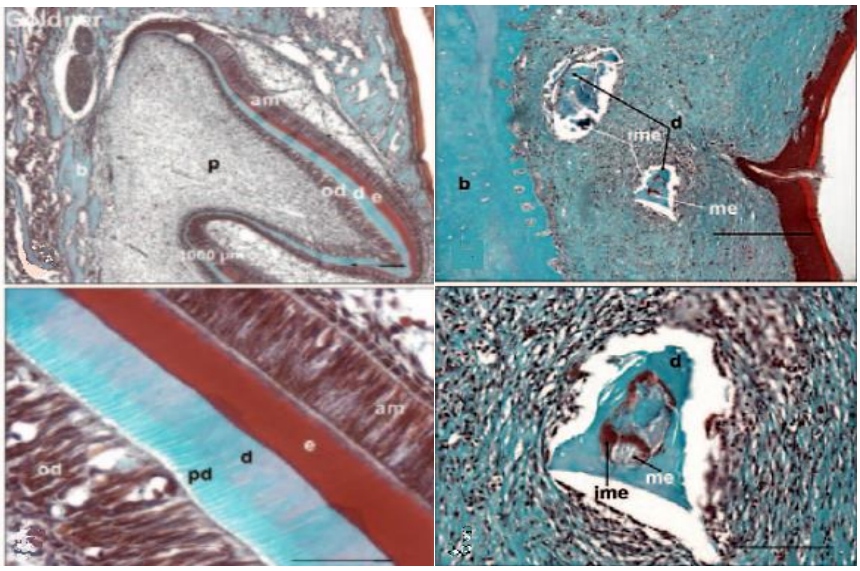

Figure 54 : Analyse histologique d'implants expérimentaux de 12 semaines récoltés et sectionnés. Am : améloblastes ; b : os ; d : dentine ; e : émail ; imm : émail immature ; me : émail mature ; od : odontoblastes ; p : pulpe ; pd : prédentine. Le trichrome de Goldner, qui colore l'émail nouvellement formé (rouge/brun), l'émail mature (gris) et la dentine (d) bleu, révèle des traces distinctes de dentine (d), émail mature (me), émail (ime) et l'os alvéolaire environnant (b) dans les implants dentaires. (Source : Dualibi & al, 2008

Des tubules dentinaires et des cristaux et batônnets d'émail typiques de l'organe dentaire ont été observés. Ces tissus sont cependant légèrement désorganisés en comparaison à ceux de la dent naturelle.

On peut néanmoins souligner que ces techniques ont permis de former des tissus dentaires artificiels organisés contenant de la dentine, de l'émail, de la pulpe et un ligament alvéolo-dentaire. (Dualibi & al, 2008)

D'un point de vue macroscopique, la nature inégale des tissus minéralisés obtenus, révélée par les radiographies, concorde avec la formation observée de petites structures dentaires dans l'échafaudage. On obtient, en effet, une multitude d'odontoïdes plutôt qu'une seule dent de taille adulte morphologiquement adaptée. Les dents créées par ingénierie, après implantation et développement *in vivo*, sont entourées d'os et présentent une couronne constituée parfois d'émail plus immature que l'organe dentaire adulte, avec une morphologie cuspidienne plus ou moins plate. (Honda & al, 2006 ; Dualibi & al, 2008)

On observe ainsi des structures coronaires dentaires complexes ; néanmoins on peut signaler un développement radiculaire très réduit, voire parfois inexistant. Honda & al. ont imaginé une méthode permettant d'améliorer la formation radiculaire. Ils ont démontré qu'en permettant la génération hybride de structures dent/os, la formation osseuse alvéolaire permettrait de stimuler la rhizagenèse. (Honda & al, 2006)

Sumita & al., quant à eux, ont comparé l'efficacité des régénérations dentaires basées sur l'utilisation d'un échafaudage en fibres de PGA et celle d'une éponge collagénique en guise de matrice.

Il semblerait qu'on obtient une surface de tissus calcifiés plus grande avec l'échafaudage collagénique. A l'instar de ceux obtenus grâce à la matrice de PGA, les tissus générés sont légèrement désorganisés ; en revanche l'éponge collagénique permet, elle, d'obtenir des structures radiculaires. (Sumita & al, 2006 ; Honda & al, 2008)

Sonoyama & al, qui avaient proposé l'étude de la « dent hybride », ont observé 8 semaines après transplantation, la formation de cément à la surface de l'échafaudage HA/TCP. Ils ont également observé la présence de fibres de Sharpey caractérisées histologiquement par l'ancrage de fibres de collagène dans le cément.

La tomodensitométrie et l'observation histologique ont confirmé l'analyse macroscopique. On observe la formation d'une structure de tissus ressemblant à une racine minéralisée et un espace ligamentaire parodontal. De plus, les racines nouvellement formées ont démontré une résistance à la compression très correcte. (Sonoyama & al, 2006)

On réalise cependant qu'une des contraintes majeures de l'ingénierie tissulaire de l'organe dentaire est liée à la croissance des germes, qui est difficilement compatible avec l'utilisation d'échafaudages pour diriger la morphologie. (Nait Lechger & al, 2009)

- Méthode d'agrégation cellulaire

Jusqu'ici, la dent créée par génie biologique assisté par échafaudage était souvent plus petite que les dents naturelles, car il était impossible de régler les dimensions de la couronne, la position des cuspides et la morphologie dentaire.

Nakao & al. ont montré en 2009 à travers une méthode Germe d'Organe, que les dimensions de la couronne et le nombre de cuspides pouvaient être régulés par la longueur de la zone de contact entre les cellules épithéliales et mésenchymateuses, sans toutefois dépendre du nombre de cellules. (Nakao & al, 2009) (Figure 55)

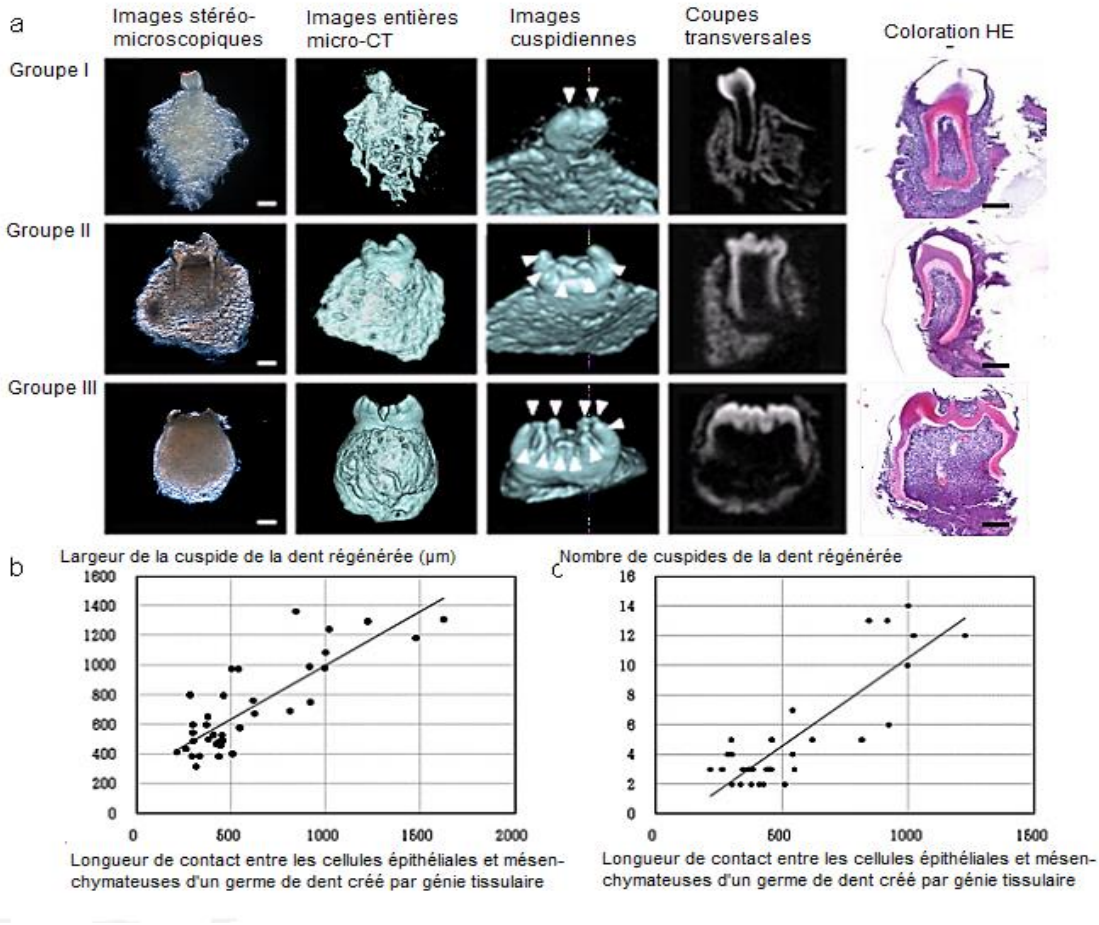

Figure 55 : Régulation de la largeur de la couronne et du nombre de cuspides de la molaire bio-générée par la méthode de manipulation cellulaire en fonction de la longueur de la zone de contact : groupe I : jusqu'à 450 µm ; groupe II : 450 à 900 µm ; et groupe III : 900-1500 µm. (a) Analyse morphologique et histologique de trois types de dents bio-générées après 21 jours de transplantation. Images stéréoscopiques (premières colonnes à gauche), images de MicroCT (deuxième colonne), images cuspidiennes (troisième colonne), coupes transversales (quatrième colonne). Flèche : cuspide. (Echelle, 200 µm). (b) Diagramme de dispersion de l'analyse corrélationnelle entre la longueur de contact et la largeur de la couronne de la dent créée par génie biologique. (c) Diagramme de dispersion de l'analyse corrélationnelle entre la longueur de contact et le nombre de cuspides de la dent créée par génie biologique. (Source : Nakao & al, 2009)

Le protocole d'agrégation de cellules germinales induit la différenciation des odontoblastes, des améloblastes et des cémentoblastes, capables de sécréter respectivement la prédentine, la dentine, l'émail et le cément.

A l'échelle microscopique, la prédentine générée est constituée de fibres de collagène typiques, légèrement désorganisées. La dentine minéralisée, quant elle, présente des

tubuli dentinaires, des cristaux d'hydroxyapatite ainsi qu'un fort taux de calcium et de phosphate.

Concernant l'émail, on retrouve une organisation typique de ses cristaux en prisme, et un très fort taux de calcium et de phosphate.

A la jonction entre la couronne et la racine, les cémentoblastes sécrètent des fibres de collagène suivant un arrangement spécifique : des fibres crestales à orientation apicale et des fibres horizontales, de la même manière que la dent naturelle. (Keller, 2012 ; Ono & al, 2017)

Macroscopiquement, la méthode Germe d'Organe permet de reconstituer un germe qui accumule progressivement des tissus durs et génère une dent multicuspidée de dimension contrôlée. Celle-ci présente une morphogenèse coronaire correcte et induit la formation des racines, ainsi que du parodonte. On constate une croissance radiculaire progressive et un volume osseux alvéolaire accru.

Il est à noter qu'une unité dentaire a également été générée avec succès. Elle était dotée de la structure correcte d'une molaire dans son ensemble ainsi que du tissu parodontal et de l'os alvéolaire environnant.

On peut également observer un allongement continu des racines dans la période suivant l'implantation ainsi qu'un rétrécissement du foramen apical, en absence de contraintes occlusales. (Oshima & al, 2011)

1.1.3 Récupération de la fonction nerveuse

Le système nerveux périphérique joue un rôle important dans la régulation des fonctions organiques et dans la perception des stimuli externes tels que la douleur et le stress mécanique. (Figure 56) Au cours du développement du système nerveux périphérique, les axones en croissance migrent et établissent des connexions avec les organes cibles en développement.

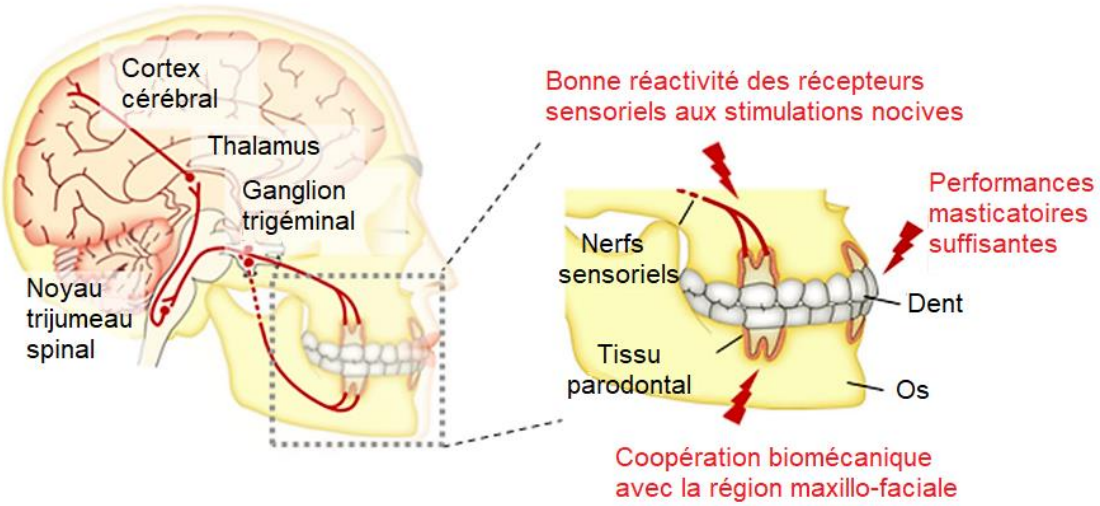

Figure 56 : La coordination des fonctions buccales par les articulations temporo-mandibulaires et les muscles masticateurs est contrôlée par le système nerveux central. La dent est un organe cible périphérique des nerfs trijumeaux sensoriels et sympathiques, qui jouent tous deux un rôle important dans la fonction et la protection des dents. (Source : Oshima & Tsuji, 2015)

- Innervation et sensibilité

Bien que les fonctions de plusieurs organes internes, notamment le foie, les reins et le pancréas, soient aussi induites par des facteurs humoraux spécifiques (hormones, cytokines) via la circulation sanguine ; la perception des stimuli externes est également essentielle à la fonction de plusieurs organes, tels que les yeux, les membres et les dents.

La dent est donc bien reconnue comme un organe cible périphérique des nerfs sensoriels du trijumeau, indispensables à leur fonction et à leur protection.

Hormis la fonction sensorielle, les fibres nerveuses participent à la régulation physiologique et pathologique du flux sanguin (vaso-régulation), aux réactions inflammatoires (par le jeu d'interactions avec les cellules immunitaires pulpaires) et aux processus de réparation et régénération tissulaire. (Ikeda & al, 2009)

Lumsden & Buchanan ont montré en 1986 que l'odontogenèse est possible en absence d'innervation. Si celle-ci ne semble pas indispensable au déroulement des premiers stades du développement dentaire, elle est essentielle à la thérapie régénérative tissulaire dentaire et une potentielle future thérapie de remplacement. Elle est aussi très importante pour que les dents soient physiologiquement fonctionnelles. (Nait Lechger, 2010)

Certaines techniques permettent d'optimiser la réinnervation de la dent, ou de l'accélérer. En effet, celle-ci n'est pas systématique et peut prendre du temps à intégrer la dent créée par bio-ingénierie.

On sait par exemple, qu'une thérapie immunosuppressive à base de Cyclosporine A accélère l'innervation des tissus implantés. *Kuchler & al* sont parvenus au même résultat en utilisant des BMSCs qui permettent d'installer une immunomodulation et dont les cellules expriment des facteurs neurotrophiques (NG, BDNF, NT3) qui stimulent la croissance neuronale. L'utilisation de cellules autologues de la moelle osseuse permettra donc de stimuler l'innervation sans traitement immunosuppresseur. (Strub & al, 2018)

Cependant, les résultats concernant l'innervation de la dent créée par la Méthode Germe d'Organe semblent déjà très prometteurs.

En effet, on observe :

- des fibres nerveuses immunoréactives anti-neurofilamentaires (NF) dans la pulpe, les tubuli dentinaires et le ligament alvéolo dentaire (comme pour une dent normale) :
- le neuropeptide Y dans la pulpe et dans le ligament alvéolo-dentaire. Il est synthétisé dans les nerfs sympathiques ; (Kökten & al, 2014)
- le peptide lié au gène de la calcitonine (CGRP) dans la pulpe et le ligament alvéolo-dentaire. Le CGRP est lui synthétisé par les nerfs sensoriel et impliqué dans la détection de la douleur dentaire. (Ikeda & al, 2009)

Ces observations témoignent du fait que les fibres nerveuses, telles que les nerfs sensoriels et sympathiques, innervent à la fois la pulpe et le ligament périodontal d'une dent régénérée qui a fait son éruption avec succès après la transplantation d'un germe ou d'une unité créée par ingénierie tissulaire. Ces dents bio-régénérées ont un potentiel proprioceptif d'identification et de réponse aux stimulations nocives dans la région maxillo-faciale : à la fois au stress mécanique par traitement orthodontique et à l'exposition pulpaire. Elles peuvent également transduire correctement ces stimulations vers le système nerveux central par le biais de neurones immuno-réactifs c-Fos. (Nakajima & al, 2014)

- Réponse aux agressions

Ainsi, le système nerveux périphérique joue un rôle important dans le contrôle du fonctionnement des organes et dans la perception de la douleur et du stress mécanique. Cette perception est importante pour la protection et le bon fonctionnement de l'appareil manducateur. Les neurones du ganglion trijumeau, qui innervent la pulpe et le ligament parodontal, peuvent détecter ces événements et transmettre les signaux correspondant au système nerveux central.

Le potentiel perceptif des neurones de la dent créée par bio-ingénierie a été observé et analysé face à des stimulations nocives telles que le traitement orthodontique et la stimulation pulpaire. L'expression de la galanine, qui est un neuropeptide impliqué dans la transmission de la douleur, a augmenté en réponse à une stimulation douloureuse persistante des terminaisons nerveuses dans le ligament de la dent bio-régénérée, dans les mêmes proportions qu'une dent naturelle. On observe ensuite la transmission de ces seuils de douleur vers le système nerveux central par le biais de neurones immunoréactifs c-Fos. (Jamal, 2016)

De même, l'immunoréactivité des neurones c-Fos positifs des dents normales et des dents modifiées a augmenté deux heures après la stimulation pulpaire, mais n'a pas pu être détectée après 48h. Ces données indiquent que les fibres nerveuses innervant à la fois la pulpe et le ligament parodontal de la dent générée par ingénierie tissulaire

ont un potentiel perceptif de stimulations nociceptives et peuvent transduire ces événements vers le système nerveux central. (Ikeda & al, 2009 ; Oshima & al, 2011)

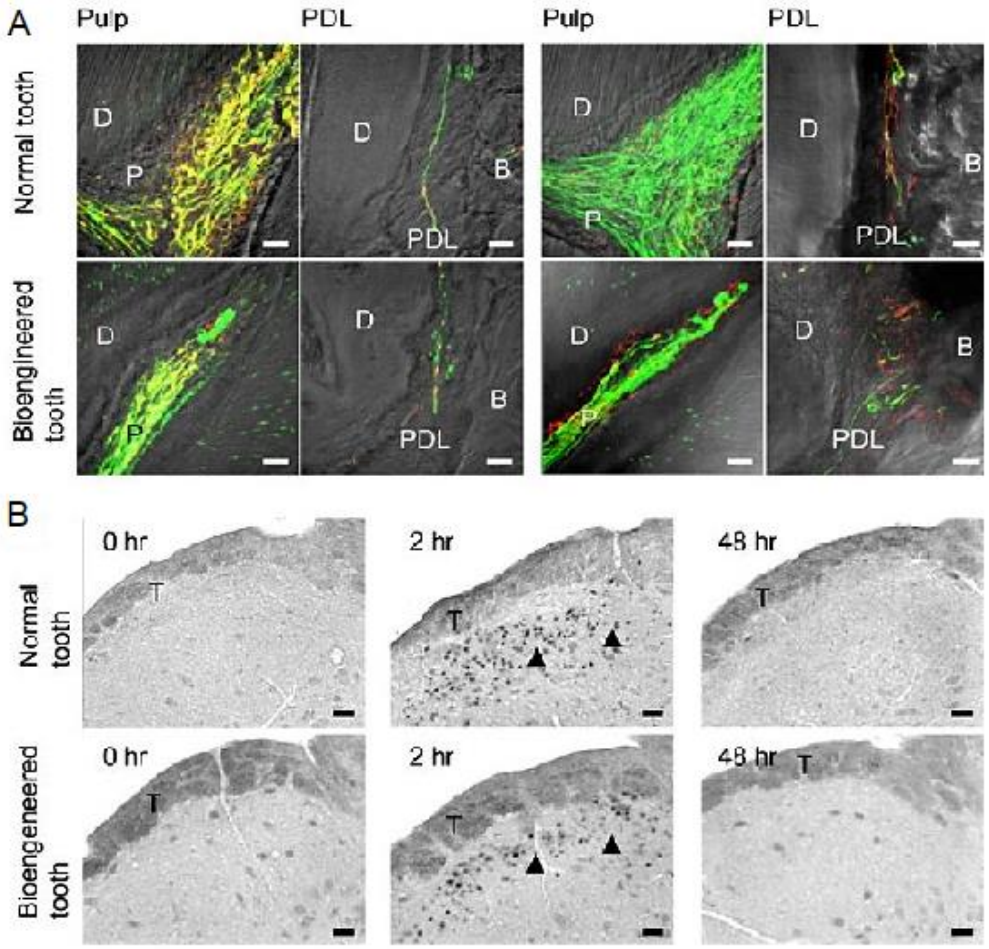

Figure 57 : Réponse de la douleur au stress mécanique et à la stimulation pulpaire. Le peptide lié au gène de la calcitonine (CGRP), synthétisé dans les nerfs sensoriels et impliqué dans la détection de la douleur dentaire, a également été observé dans les neurones de la pulpe et du ligament. NPY et CGRP ont été détectés à la fois dans les neurones anti-NF positifs et les neurones immunoréactifs négatifs. (A) Les fibres nerveuses de la pulpe et du ligament alvéolo-dentaire de la dent normale (supérieure) et de la bio-ingénierie (inférieure) ont été analysées par immunohistochimie en utilisant des anticorps spécifiques pour la combinaison (2 colonnes de gauche) de NF (vert) et NPY (rouge) et de la combinaison (2 colonnes de droite) de NF et CGRP (rouge). (Echelle, 25 µm.) (B) Analyse de l'immunoréactivité de c-Fos dans la corne médullaire de souris sur une dent normale (supérieure) ou une dent bio-générée (inférieure) après 0h (Gauche), 2h (centre) et 48h (droite) de stimulation par exposition de la pulpe. L'expression de c-Fos (flèche) était évidente dans la corne dorsale médullaire après 2h et 48h d'exposition à la pulpe. (Echelle : 50 µm) D : dentine ; P, pulpe ; B : os ; PDL : ligament parodontal ; T : tractus trijumeau de la colonne vertébrale. (Source : Ikeda & al, 2009)

Ces résultats indiquent que la thérapie régénérative de la dent entière a le potentiel de restaurer complètement la fonction sensorielle de la dent, y compris le potentiel masticatoire en réponse à un stress mécanique et le potentiel perceptif de stimuli nocifs. (Hirayama & al, 2013)

1.1.4 Vascularisation

Le système vasculaire joue un rôle important au cours de l'embryogenèse. Il est essentiel à la croissance de tous les tissus et organes. Les vaisseaux sanguins assurent l'apport des nutriments, dont l'oxygène, et les échanges métaboliques nécessaires pour l'organogenèse.

La formation des vaisseaux nécessite l'intervention coordonnée de facteurs multiples.

Cela comprend :

- des molécules dont l'activité est essentiellement vasculaire comme l'angiogénine, l'angiotropine, le facteur de perméabilité vasculaire,
- surtout des facteurs de croissance (VGEF, FGF, PDGF, etc.)
- les molécules BMPs dont l'action est plus vaste. (Nait Lechger, 2010)

Au fur et à mesure du développement dentaire, un réseau capillaire se met en place, tout d'abord autour et ensuite dans le mésenchyme dentaire jusqu'à proximité de l'épithélium dentaire interne.

Depuis les années 1950, de nombreux travaux ont été consacrés à l'étude de la vascularisation au cours de l'odontogenèse, à l'étude de la revascularisation des dents transplantées, et enfin à l'étude de la revascularisation des germes dentaires implantés après culture *in vitro*.

La vascularisation est un système indispensable à l'organogenèse, aux cyto-différenciations et à l'activité mitotique. Elle est donc capitale pour le développement d'un protocole d'ingénierie tissulaire dentaire.

Les résultats *in vitro* montrent qu'il est possible d'obtenir le développement d'une couronne dentaire à partir des réassociations entre les cellules épithéliales et mésenchymateuses avec le maintien des structures vasculaires.

Les résultats après implantation indiquent la présence des vaisseaux sanguins tout d'abord autour des implants, puis dans la pulpe dentaire.

Cependant, la revascularisation des molaires naturelles est plus rapide que dans les dents formées par réassociations cellulaires. Des études ont montré que les protocoles de traitement mécanique, et enzymatique employés dans les techniques de dissociation/réassociation seraient à l'origine de ces différences de cinétique. (Sari, 2014) Après 2 semaines, des vaisseaux sanguins étaient présents dans la totalité de la dent et des tissus parodontaux. Ces vaisseaux nouvellement formés contenaient des érythrocytes, attestant de leur fonctionnalité. Les structures de réassociations cellulaires ont été revascularisées après l'implantation et les résultats montrent que les vaisseaux sanguins provenaient de l'hôte.

Bien qu'elle n'ait pas été stimulée par le biais de facteurs de croissance exogènes, la revascularisation de tous les tissus dentaires s'est produite dans tous les cas.

Ainsi, les vaisseaux sanguins nouvellement formés lors des réassociations cellulaires n'ont pas été impliqués dans le rejet de l'implant, mais dans son développement, sa croissance et sa survie. (Nait Lechger & al, 2008) Cette condition de revascularisation doit être satisfaite pour permettre le bon déroulement de ces étapes et la formation des matrices dentinaires, amélaires et du cément lors de la rhizagenèse. (Nait Lechger, 2010 ; Keller, 2014)

1.1.5 Dureté et potentiel masticatoire

La mastication est un processus physiologique nécessaire à la déglutition et à la digestion, elle est donc indispensable à la nutrition de l'individu. Le potentiel masticatoire est permis par une combinaison de plusieurs facteurs : l'articulation-temporo-mandibulaire, les muscles masticatoires et l'appareil manducateur. Au niveau dentaire, une occlusion fonctionnelle, une résistance et une dureté adaptée des tissus en sont le vecteur principal.

L'occlusion établie entre la dent générée par ingénierie et les dents antagonistes a été analysée.

La dent générée par ingénierie tissulaire s'est déplacée physiologiquement en réponse aux contraintes mécaniques et s'est positionné dans une occlusion normale en harmonie avec les autres dents. On a obtenu des contacts antagonistes aux cuspides qui ont maintenu des dimensions verticales occlusales appropriées entre les deux arcades. (Ishida & al, 2009)

Ikeda & al ont effectué un test de dureté Knoop. Il s'agit d'un test de dureté mécanique qui est utilisé notamment pour étudier les matériaux fragiles. Elle se révèle être un paramètre important pour l'évaluation des fonctions masticatoires de la dent régénérée, y compris les composants de la dentine et de l'émail.

La dureté Knoop de l'émail et de la dentine de dents naturelles chez des souris âgées de 3 semaines et de 9 semaines augmente de manière significative au cours de la période postnatale. Ces valeurs ont été mesurées chez la souris adultes âgées de 9 semaines à 447,7 ± 88,9 degrés de dureté pour l'émail et 88,4 ± 10,2 degrés de dureté Knoop (KHN) pour la dentine. Les mêmes mesures prises sur la dent générée par bio-ingénierie étaient respectivement de 461,1 ± 83,2 et de 81,4 ± 7,53 KHN. Ces résultats indiquent que la dureté de la dent générée se situe dans la plage normale.

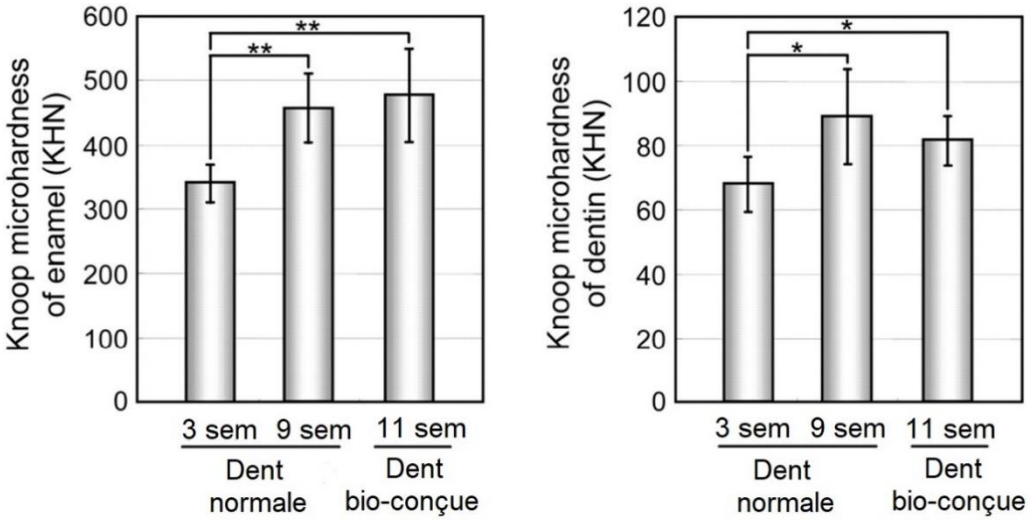

Figure 58 : Évaluation de la dureté de la dent générée par ingénierie tissulaire. Les valeurs de microdureté Knoop de l'émail (gauche) et de la dentine (droite) de la dent créée par génie biologique 11 semaines après la transplantation ont été comparées à celles des dents naturelles de souris âgées de 3 et 9 semaines. (Source : Ikeda & al, 2009)

Oshima & al ont, eux, obtenu une dureté de l'émail de la dent créée par ingénierie tissulaire présentant des valeurs plus faibles de KHN au début du développement dans la capsule rénale. Cette dureté avait augmenté pour atteindre une valeur élevée et normale après la transplantation dans la mandibule.

Ces résultats indiquent donc que les duretés de l'émail et de la dentine dans les dents bio-générées sont très satisfaisantes et tout à fait capables d'assurer un potentiel masticatoire efficace. (Oshima & al, 2011)

1.2 **Régénération du ligament alvéolo-dentaire**

La perte dentaire et les troubles fonctionnels des ligaments parodontaux causent des problèmes fondamentaux aux fonctions orales en affectant l'élocution, la mastication, l'occlusion et sont la cause de problèmes de santé associés. (Nakajima & al, 2014)

1.2.1 Présence de ligament fonctionnel

Pour assurer une thérapie régénérative dentaire efficace, la dent créée par génie tissulaire doit avoir la structure dentaire correcte ainsi qu'une fonctionnalité biologique appropriée *in vivo*. Le ligament parodontal joue un rôle essentiel dans les réactions pathogéniques et physiologiques des dents ; notamment les réactions aux forces mécaniques provenant du remodelage osseux causé par la croissance, le vieillissement et le déplacement orthodontique. (Hirayama & al, 2013) Ce ligament permet également une proprioception de l'organe dentaire lors de la mastication. Celle-ci est limitée voire inexistante chez les patients ayant des implants vissés artificiels. (Ikeda & al, 2011)

Lors de la régénération de la racine biologique par la technique de la dent hybride, la racine en question était entourée de tissu de ligament parodontal et semblait avoir une relation naturelle avec l'os environnant. (Huang & al, 2009)

A l'instar de cette technique, la plupart des autres équipes qui avaient généré une dent avec racine, ont réussi à obtenir une structure organisée comprenant tous les tissus dentaires et parodontaux, y compris un ligament alvéolo-dentaire qui permettait une intégration parfaite de la dent dans son environnement parodontal.

L'un des principaux domaines à évaluer est la réponse biologique de la dent créée par génie tissulaire aux contraintes et charges mécaniques. Les dysfonctionnements des ligaments parodontaux dans le cas de maladies ou de blessures parodontales pourraient entraîner des problèmes physiologiques critiques, tant pour la mastication fonctionnelle que pour la santé en général. (Jamal, 2016)

1.2.2 Capacité de déplacement notamment orthodontique

Les études ont montré que les germes et les unités de dents matures créés par bio-ingénierie pouvaient reconstituer un ligament parodontal fonctionnel et permettre le remodelage osseux. (Hirayama & al, 2013)

L'analyse histochimique du ligament parodontal de notre dent conçue par bio-ingénierie a montré un lien positif entre cette dent et l'os alvéolaire, suggérant que cette dent pourrait être sensible aux contraintes mécaniques.

Les équipes d'Ikeda & al. et d'Oshima & al. ont démontré que le remodelage osseux alvéolaire est induit via la réponse du ligament généré à des contraintes mécaniques telles que les mouvements associés aux traitement orthodontiques. (Figure 59)

Lorsque la dent bio-générée a été déplacée dans le milieu buccale pendant 17 jours grâce à une force mécanique dans un modèle expérimental, elle était aussi performante qu'une dent naturelle. L'analyse histochimique a également révélé des modifications morphologiques du ligament parodontal sur les deux côtés avec une tension linguale et une compression vestibulaire après 6 jours de traitement.

Les équipes ont également observé de chaque côté respectivement, des cellules de type ostéoblaste pour la formation osseuse, de forme parallélépipédique à noyaux arrondis, et des cellules ostéoclastes pour la résorption osseuse, qui sont des cellules géantes multinucléées. (Ikeda & al, 2009 ; Oshima & al, 2011)

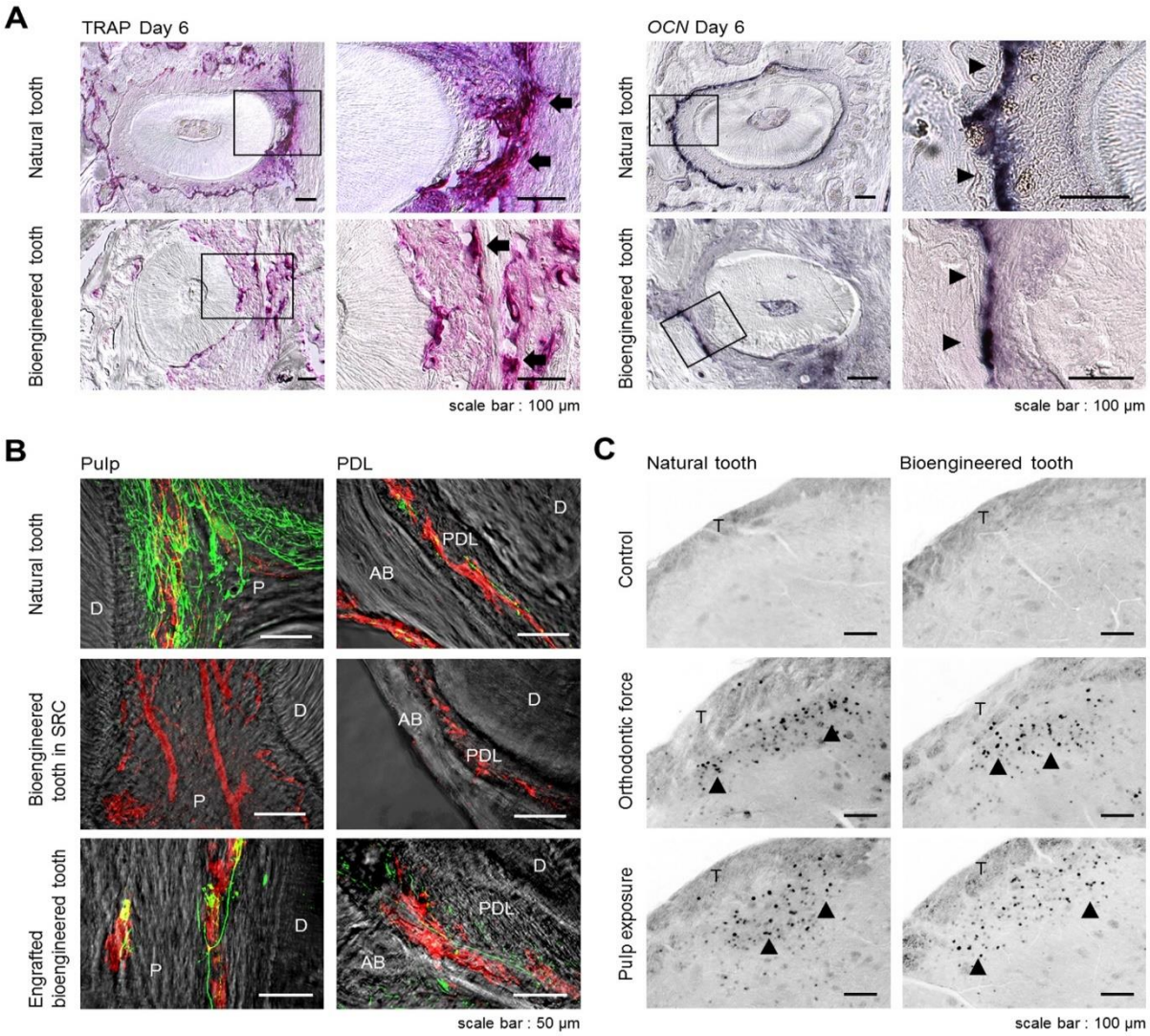

Figure 59 : Mouvement expérimental des dents et réponse de la douleur au stress mécanique. La réponse du ligament à des contraintes mécaniques induit un remodelage osseux alvéolaire, indiqué par la localisation d'ostéoblastes positifs à la phosphatase acide résistant au tartrate (TRAP) et à l'ostéocalcine (Ocn). (A) Des coupes de dents naturelles et bio-générées ont été analysées par coloration TRAP et hybridation in situ de l'ARNm Ocn au jour 6 du traitement orthodontique. Les cellules positives pour TRAP (flèche) et les cellules positives pour ARNm d'Ocn (flèche) sont indiquées. (B) Les fibres nerveuses et les vaisseaux sanguins de la pulpe et du ligament périodontal d'une dent naturelle (en haut), une unité de dent créée par génie biologique dans une SRC (au centre) et une dent de bio-ingénierie dans les 40 jours suivant la transplantation (en bas) ont été analysés par immunohistochimie en utilisant des anticorps spécifiques du neurofilament (NF ; vert) et du facteur de von Willerbrand (vWF ; rouge). Echelle : 50 µm. D : dentine ; P : pulpe ; AB : os alvéolaire ; PDL : ligament parodontal. (C) Analyse des neurones immunoréactifs de c-Fos dans les cornes médullaires de souris après 0 heure (pas de stimulation, contrôle ; en haut), 2 heures de stimulation par force orthodontique (milieu) et exposition pulpaire (en bas). Le C-Fos (flèche) était détectable après ces stimulations à la fois dans les dents naturelles (à gauche) et sur celles ayant été régénérées 40 jours après la transplantation (à droite). Echelle : 100 µm. T : tractus trijumeau spinal. (Source : Oshima & al, 2011)

Ono et al en 2017 ont également observé le déplacement orthodontique, induisant avec succès le mouvement dentaire en réponse à un stress mécanique sans ankylose. (Ono & al, 2017) (Figure 60)

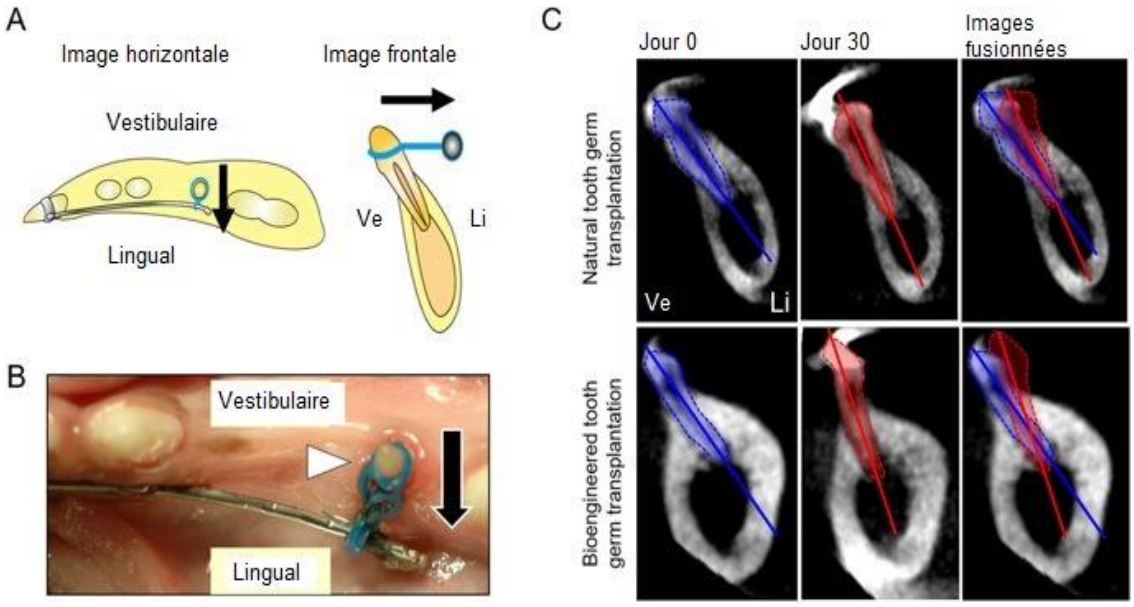

Figure 60 : (**A**) Représentation schématique du mouvement orthodontique de la dent naturelle, de la dent en éruption formée par transplantation de germe naturel et de la dent bio-générée. (**B**) Photographie orale de l'appareil orthodontique conçu pour la dentition canine. Les dents en éruption ont été soumises à une force orthodontique horizontale (du côté vestibulaire au côté lingual) pendant 30 jours à l'aide d'un appareil orthodontique. Flèche blanche : dent en éruption ; flèche noire : direction de la force orthodontique. (**C**) Images tomodensitométriques du mouvement dentaire de la dent en éruption formée par transplantation de germe naturel et de la dent créée par génie tissulaire avant le traitement orthodontique (colonne de gauche, en bleu) et après le traitement orthodontique (colonne centrale, rouge). Images fusionnées avant et après le traitement orthodontique (colonne de droite). (Source : Ono & al, 2017)

Ces découvertes suggèrent qu'une dent générée par ingénierie tissulaire pourrait bien être adaptée aux forces mécaniques comparables à celles subies par une dent naturelle. En outre, cette approche sera supérieure à celle de l'implant dentaire traditionnel qui est dépourvu de ligament alvéolo-dentaire et ne formule donc pas une réponse adéquate aux contraintes mécaniques. (Jamal, 2016)

1.3 Régénération osseuse

La perte dentaire entraîne une importante résorption de l'os alvéolaire, qui est médiée par le ligament alvéolo-dentaire, dans les dimensions verticale et horizontale. La perte de cet os, qui entraîne des problèmes à la fois fonctionnels et esthétiques, est difficile à corriger avec les traitements dentaires classiques tels que l'implant dentaire traditionnel et la greffe de dent autologue. (Oshima & al, 2011)

La génération d'une dent entière associée à l'os alvéolaire en tant qu'unité, a fait l'objet de recherche dès 2006, lorsque les défauts de développement radiculaire étaient observés chez les premières dents créées par génie tissulaire. Ces études ont démontré que les racines dentaires obtenues à partir des constructions hybrides dent/os étaient en réalité plus développées que celles formées par les seules générations dentaires, ce qui en fait une approche très prometteuse. (Dualibi, 2006)

Dans le cas d'une unité dentaire mature transplantée à partir de la capsule rénale, comprenant une dent mature, un ligament parodontal et un os alvéolaire, le problème majeur était de savoir si l'unité pouvait être greffée dans la zone édentée par intégration osseuse, et fonctionner correctement en occlusion avec les dents antagonistes, impliquant des phénomènes de remodelage osseux chez le receveur.

Lors de la transplantation de l'unité dentaire, la dent est située dans une position atteignant le plan occlusal de la dent antagoniste. Une intégration osseuse partielle a été observée 14 jours après la transplantation, et une intégration osseuse complète autour de la racine dentaire bio-générée a été observée 30 jours après la transplantation. Dans l'os alvéolaire de la dent créée par bio-ingénierie marqué à la calcéine, une résorption a été partiellement observée à la surface 30 jours après la transplantation. L'os marqué à la calcéine a finalement disparu et l'os du récepteur autour de la racine l'a complètement remplacé 40 jours après la greffe. (Oshima & al, 2011) (Figure 61)

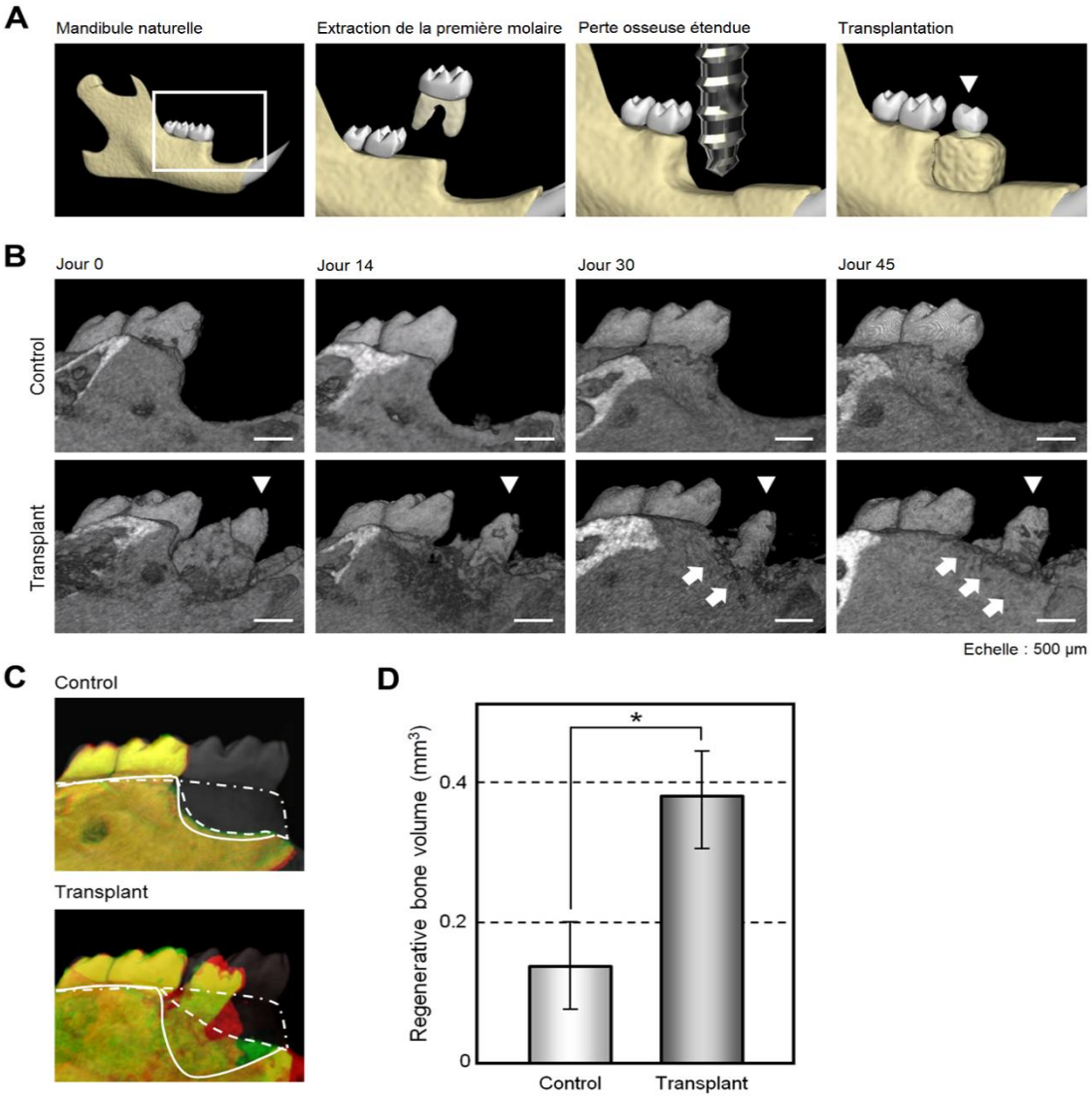

Figure 61 : Régénération de l'os alvéolaire à la suite de la transplantation d'une unité dentaire obtenue par bio-ingénierie. (**A**) Représentation schématique d'un modèle murin de défauts osseux étendus et de la transplantation d'une unité dentaire générée par ingénierie tissulaire (flèche). (**B**) Images par micro-tomographie des processus de régénération de l'os alvéolaire vertical dans une unité de contrôle sans transplantation (supérieur) et après la transplantation d'une unité dentaire bio-générée (flèche, inférieure) dans un modèle murin de défaut osseux étendu. Une formation osseuse verticale a été observée à partir de l'os adjacent du receveur (flèche). (**C**) Superposition tridimensionnelle d'images de tomodensitométrie de la dentition naturelle au micro-scanner (ligne grise en double pointillé), unité de dent transplantée (inférieure) et contrôle sans transplantation (partie supérieure) au jour 0 dans un défaut osseux étendu (ligne rouge), et à 45 jours après la transplantation (ligne verte en pointillé). Les délimitations de l'os alvéolaire receveur sont indiqués par chaque ligne. (**D**) Volume osseux régénéré dans la région buccale à la suite de la transplantation d'une unité dentaire bio-générée (transplantation) et absence de transplantation (témoin) au jour 45 dans un défaut osseux étendu. (Source : Oshima & al, 2011)

L’implantation de l’unité dentaire obtenue par bio-ingénierie permet donc un gain tissulaire osseux et une intégration réussie aux tissus environnants. Ces résultats montrent le potentiel de cette méthode en tant que nouvelle approche thérapeutique pour la récupération des performances masticatoires après la perte dentaire. (Hirayama & al, 2013)

La régénération osseuse a été tentée pendant de nombreuses années grâce à l'utilisation de méthodes de régénération osseuse guidées, de greffe autologue d'os ou de cellules et de thérapies à la cytokine avec BMP, FGF ou PDGF. Aucun protocole clinique traditionnel idéal pour la régénération osseuse dans les dimensions verticale et horizontale n’avait encore été établi.

Une formation osseuse verticale a été observée à partir de l'os marginal du receveur 14 jours après la transplantation. Ces résultats indiquent que la greffe d'une dent créée par génie tissulaire présente un grand potentiel non seulement pour la future thérapie de régénération de la dent entière, mais également pour le traitement des cas cliniques où l’édentement est accompagné d'une grave anomalie de l'os alvéolaire.

Finalement, nous constatons que l’implantation des molaires et des unités dentaires cultivées dans le diastème des mâchoires de souris adultes permet le développement des dents avec des couronnes complètes, une croissance des racines et l’ensemble du système d’ancrage ainsi que la revascularisation et l’innervation du transplant.

Tableau 5 : Tableau récapitulatif des résultats obtenus par quelques-unes des études de la régénération de la dent entière. (Source : Bhanja & D'Souza, 2016)

Année	Chercheur	Source de cellules	Echa-faudage	Technique	Résultats
2002	Young & al	Bourgeon de la troisième molaire de porc	PGLA	Maturation chez le rat immunodéficient pendant 20 à 30 semaines.	Structures dentaires reconnaissables formées contenant de la dentine et une chambre pulpaire bien définie.
2004	Dualibi & al	Cellules du bourgeon dentaire	PGA PLGA	Epiploon de rats hôtes pendant 12 semaines.	Des cellules de bourgeon dentaire post-natal de rat (PN4) ensemencées pendant 1h sur des écha-faudages PGA ou PLGA ont généré des tissus dentaires de manière très fiable.
2004	Ohazama & al	Épithélium embryonnaire oral de souris (JE10) ; population de cellules non dentaires à partir de cellules souches embryonnaires, cellules souches neurales, cellules BMD	Pas d'écha-faudage	1. recombinaison tissu-laire suivie d'une greffe dans le rein pendant 10 à 14 jours 2. rudiments de molaire ED14,5 implantés dans la région du diastème de souris adultes.	1. Dents (couronnes) développées associées aux os et aux tissus mous 2. La dent ectopique était de taille normale et présentait une histologie normale.
2005	Honda & al	Bourgeons de la troisième molaire de porc	Maille PGA	Analyse immunohisto-chimique du processus de régénération après la transplantation d'un échafaudage ensemencé dans l'organisme de rats athymiques pendant 2 à 25 semaines.	Le processus de régénération est parallèle à l'odontogenèse naturelle. La taille des dents, la forme et la formation des racines diffèrent.

2005	Young & al	Bourgeons de la 3ème molaire porcine, ostéoblastes induits par les cellules progénitrices de la moelle osseuse	PGA PLGA	1. échafaudage dentaire ensemencés cultivées pendant 4 semaines chez des rats adultes 2. ostéoblastes induits ensemencées sur des échafaudages de PLGA, cultivées pendant 10 jours Les ligaments alvéolo-dentaires sont cultivés dans l'épiploon du rat.	Génération de structures hybrides d'os dentaire dont l'histochimie ressemble à celle des tissus osseux et parodontaux.
2007	Honda & al	Troisième molaire porcine – épithélium, mésenchyme	Eponge de collagène	Nouvelle technique d'ensemencement cellulaire : ensemencement séquentiel de cellules mésenchymateuses et épithéliales sur un échafaudage.	La morphologie dentaire in vivo était similaire à celle d'une dent naturelle, et une structure de dent était formée dans chaque échafaudage.
2007	Nakao & al	Cellules souches prélevés sur les bourgeons dentaires d'embryon de rat	Pas d'écha-faudage	Technique de manipulation cellulaire tridimensionnelle : réorganise les cellules souches embryonnaires épithéliales et mé-senchymateuses en augmentant la densité cellulaire et en les compartimentant.	La morphologie dentaire in vivo était similaire à celle d'une dent naturelle et une structure de dent était formée dans chaque cas. Plusieurs dents structurel-lement correctes ont été générées *in vitro* et *in vivo* après une transplantation dans la mandibule.
2008	Dualibi & al	Cellules de bourgeon dentaire de rat à 4 dpn	PGA / PLLA & PLGA	Prélevées, ensemencées sur un échafaudage, puis implantées dans l'alvéole d'une dent récemment extraite pendant 12 semaines.	De nombreuses petites couronnes dentaires contenant de l'émail, de la dentine, de la pulpe et des tissus parodontaux ont été générées. Moins organisées que celles cultivées dans l'épiploon.
2009	Ikeda & al	Cellules germinales de molaires de souris JE14,5	Pas d'écha-faudage	Transplantation de germe dentaire généré *in vitro* (méthode tri-dimensionnelle de Germe d'Organe) dans la mandibule d'une souris adulte.	Dent générée par bio-ingénierie après éruption, en occlusion avec une dent antagoniste. La réponse aux stimuli nocifs était présente.

2011	Oshima & al	Souris JE14,5 molaires cellules germinales de la dent	Pas d'écha-faudage	En suivant des méthodes de culture en 3D d'organes, on a essayé de développer une dent mature dans une SRC suivie d'une transplantation dans une alvéole de dent perdue de souris	Une dent mature correctement structurée unique et contrôlée en dimensions, développée avec un tissu parodontal. Après la transplantation dans la mâchoire, une régénération de l'os alvéolaire a été observée. La dent a également répondu aux stimuli mécaniques et nocifs.
2013	Cai & al	iPSC dérivées d'urine humaine sans intégration (ifhU-iPSC) mésenchyme molaire JE 14,5	Pas d'écha-faudage	1. Différenciation des ifhU-iPSCs en feuillets épithéliaux et recombinai-son avec le mésenchyme d'une molaire de souris 2. Culture sous-rénale de la combinaison chez la souris *nude* pendant 3 semaines.	Une structure semblable à une dent intacte s'est formée. Le marqueur moléculaire a confirmé la différenciation des ifhU-IPSC en spectroscopie Raman de l'améloblaste et la nano-indentation a démontré des propriétés physiques presque identique à l'émail

2 Perspectives et limites de l'application sur l'Homme

Les processus d'application de telles méthodes à l'Homme nécessitent une réflexion quant aux procédés et aux outils à mettre en œuvre. Ils requièrent également une vision réaliste afin de rendre possible le développement à grande échelle. De nombreux obstacles persistent.

2.1 Enjeux techniques

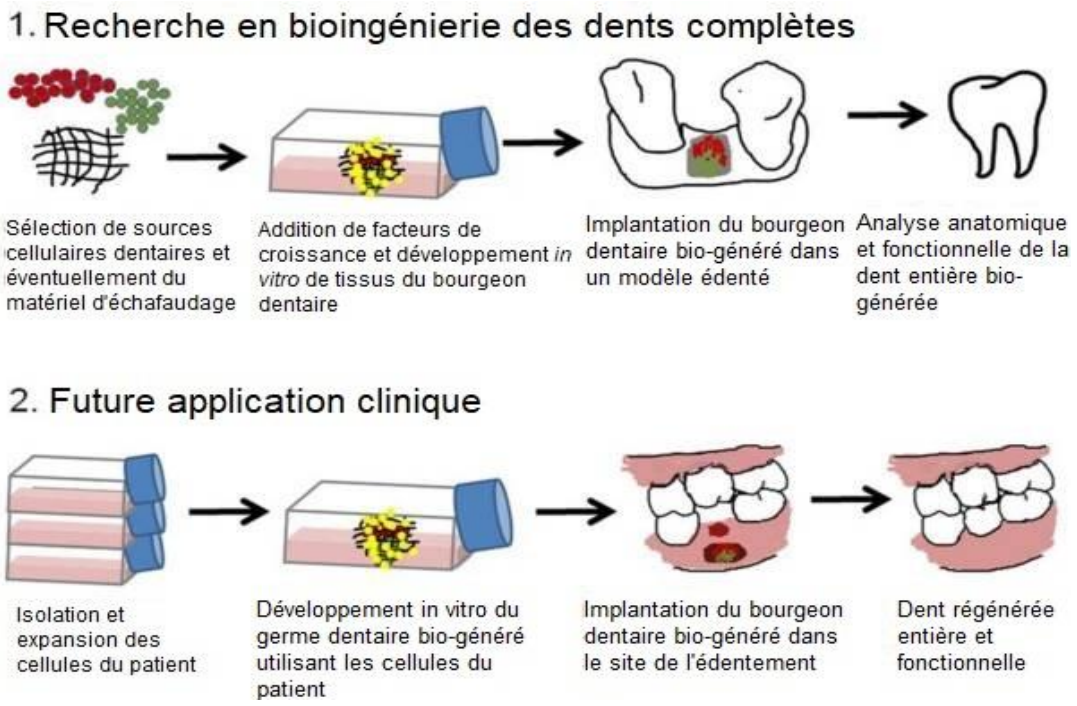

Figure 62 : Modèles de bio-ingénierie dentaire. (**1**) Objectif de recherche. Pour que la bio-ingénierie des dents complètes devienne une réalité en milieu clinique, des recherches approfondies doivent être menées. Cette recherche comprend l'identification de sources de cellules appropriées qui soutiennent le développement in vitro d'un bourgeon dentaire développé par bio-ingénierie pour une implantation dans un modèle de perte dentaire. (**2**) Applications cliniques futures. Une fois que les matériaux appropriés ont été validés, ils doivent pouvoir être facilement traduits pour les applications cliniques consistant à utiliser les cellules autologues patient pour corriger une zone de perte dentaire en régénérant une dent pleinement fonctionnelle. (Source : Smith & Yelick, 2016)

2.1.1 Ajustements techniques

En l'état actuel des connaissances, l'ingénierie tissulaire est capable de reproduire l'intégralité des tissus dentaires (émail, dentine et parodonte). La structuration de ces

tissus en une véritable dent fonctionnelle semble également à portée de main à condition de résoudre les problèmes de forme, de couleur et de bien maîtriser la taille de la dent. (Sari, 2014)

Les types de dents tels que les incisives, les canines, les prémolaires et les molaires ont des caractéristiques morphologiques uniques qui sont programmées grâce à leur site de croissance dans la cavité buccale. La taille des dents, la forme de la couronne et des racines sont des facteurs importants à prendre en compte lors de la génération d'une dent par bio-ingénierie avec une occlusion fonctionnelle et une esthétique satisfaisante. (Nakajima & al, 2014)

Idéalement, les germes de dents implantés seront en mesure de s'adapter au microenvironnement local, de recevoir les informations de position pour permettre le développement d'une dent fonctionnelle.

En conclusion, bien que de nombreux problèmes attendent d'être résolus, des progrès rapides dans l'étude moléculaire de la biologie et du développement dentaire à plus haute fréquence grâce aux nouvelles technologies faciliteront sans aucun doute la réalisation de dents implantables issues de la bio-ingénierie. (Zhang & Chen, 2014)

2.1.2 Adaptation du modèle à un « grand animal »

Le succès d'une stratégie d'ingénierie tissulaire dans un modèle animal de petite taille ne se traduit pas nécessairement chez l'Homme ou même chez les mammifères de taille similaire. [*Sheller & al, 2009*]

Ce principe soulève donc un autre problème à prendre en compte. En effet, le développement des dents humaines est un processus beaucoup plus lent que celui des dents de souris. (Volponi & al, 2010)

Ainsi, les résultats montraient que les couronnes dentaires développées par bio-ingénierie de rat se formaient en seulement 12 semaines. En revanche, les couronnes dentaires de porc se forment en 25 à 30 semaines. Le fait que les dents de rat issues de l'ingénierie biologique se soient développées plus rapidement que les dents de porc

reflète les schémas de croissance naturelle des dents chez chacun de ces deux mammifères. De même, la troisième molaire du porc nécessite environ 80 semaines pour faire son éruption, tandis que la première molaire du rat fait son éruption après environ 7 semaines. (Dualibi & al, 2008)

L'embryogenèse dentaire humaine est environ huit fois plus lente et le développement postnatal dure plusieurs années. Par conséquent, alors que la croissance, l'implantation et l'éruption des dents de souris bio-générées peuvent prendre quelques semaines, le temps équivalent à développer une denture humaine fonctionnelle peut être de plusieurs mois, voire de plusieurs années. (Volponi & al, 2010)

Il sera certainement nécessaire d'accélérer le développement du germe dentaire implanté en manipulant l'expression des gènes via l'application locale de petites molécules inhibitrices et de facteurs de croissance. (Zhang & Chen, 2014)

D'autre part, le comblement des défauts osseux et dentaires chez un rongeur est plus facile à réaliser en raison de la géométrie bien contrôlée, de la taille réduite et du taux de remodelage plus élevé. À mesure que la taille du sujet augmente, la capacité de régénérer un soutien vasculaire devient plus difficile car les cellules doivent se trouver à moins de 100 µm d'une source d'oxygène pour survivre. (Scheller & al, 2009)

2.1.3 Choix des sources cellulaires adaptées

À ce jour, la plupart des études ont démontré la régénération réussie de dents entièrement fonctionnelles par génie tissulaire, en implantant des germes dentaires développés *in vitro* composés de cellules germinales dentaires prélevées embryologiquement, dans des zones d'édentement chez la souris. (Smith & Yelick, 2016)

L'identification de populations de cellules appropriées compétentes et disponibles constitue un défi majeur pour les applications de génie biologique dentaire chez l'Homme. (Dualibi, 2006)

En outre, du point de vue de la sécurité médicale, il est souhaitable de procéder à une implantation autologue d'un organe dentaire développé à l'aide des cellules du patient afin de prévenir le rejet immunologique. (Ono & al, 2017)

Le deuxième enjeu est de réussir à se procurer des cellules disponibles et en quantités suffisantes chez le patient adulte susceptible de bénéficier d'une telle procédure. (Smith & Yelick, 2016)

Cependant, les cellules germinales des dents embryonnaires sont difficiles, voire impossibles, à utiliser en clinique :

- les cellules germinales de dents embryonnaires humaines autologues sont inaccessibles pour la régénération tissulaire chez l'adulte ;

- les cellules germinales de dents embryonnaires humaines allogènes (transmises de patients à patients) sont éthiquement inacceptables et peuvent également provoquer un rejet immunitaire et la transmission d'agents pathogènes ;

- les cellules germinales des dents embryonnaires xénogènes et non humaines induisent des problèmes de rejet immunitaire et de dysmorphogenèse dentaire (l'anatomie obtenue s'inspire de celle de la dent des espèces donneuses) ;

- les cellules germinales dentaires autologues postnatales (par exemple, celle des troisièmes molaires) ou les cellules souches/progénitrices dentaires autologues sont peu disponibles et ne semblent pas toujours suffisantes en quantité à la génération d'un organe dentaire anatomiquement correct. (Yildirim & al, 2011 ; Mao & al, 2012)

L'autre piste qui s'offre à nous, est donc l'utilisation des cellules souches adultes présentes chez le patient.

Jusqu'ici toutes les cellules souches mésenchymateuses postnatales d'origine dentaire identifiées, bien que capables de se différencier en divers types de tissus dentaires, n'ont pas la capacité d'induire des dents matures sans être combinées à des facteurs de croissance adaptés à chaque couche de tissu tridimensionnellement. (Ishida & al, 2013)

De plus, le problème de la disponibilité des cellules se pose. En effet, l'utilisation de cellules souches d'origine dentaire impliquant le prélèvement d'une dent saine est difficilement transposable à l'Homme.

L'utilisation de cellules souches mésenchymateuses obtenues à partir de dents de lait exfoliées ou de dents de sagesses cryoconservées, la transformation de kératinocytes en améloblastes, l'utilisation de cellules souches d'origine non dentaire (cellules souches pluripotentes induites, cellules souches dérivées de la moelle osseuse) sont en cours d'évaluation. Les cellules non dentaires ont pour la plupart déjà été testées pour la régénération tissulaire mais pas pour la régénération organique complète. (Sari, 2014)

Quant aux cellules souches épithéliales, on sait d'ores et déjà qu'il est impossible d'en obtenir d'origine dentaire à l'âge adulte. Certaines lignées provenant de la muqueuse buccale, paraissent prometteuses ; les études à leur sujet doivent être approfondies.

Des incertitudes persistent concernant l'immunogénicité des cellules souches et leur potentiel de transformation tumorale. (Sari, 2014)

L'utilisation de ces cellules nécessitera pour la plupart un recours aux processus de cryoconservation. Le potentiel de ces cellules à long terme doit également être étudié.

Récemment, des cellules iPSCs ont été générées à partir de divers tissus buccaux et testées pour leur capacité à se différencier en cellules épithéliales et mésenchymateuses dentaires. (Ishida & al, 2013 ; Nakajima & al, 2014)

L'utilisation des cellules iPSCs en médecine régénérative présente plusieurs avantages. Elle permet de surmonter les problèmes éthiques et pratiques liés à l'utilisation de cellules embryonnaires. Elles peuvent être utilisées en tant que cellules autologues et spécifiques au patient, ce qui élimine les problèmes liés au rejet immunitaire des greffes et devrait donc devenir le principal outil de développement de la médecine régénérative personnalisée. De plus, la production de cellules iPSCs peut

facilement être augmentée, ce qui fournit essentiellement une source illimitée de cellules pour des applications cliniques, contrairement aux cellules souches adultes.

Néanmoins, bien que l'utilisation d'iPSCs spécifiques du patient soit un avantage pour éviter le rejet lors des procédures de régénération tissulaire, le coût élevé et la durée nécessaire à la génération des iPSCs individuellement impliquent une moindre faisabilité à grande échelle. Or, Nakatasuji et al. ont découvert qu'il existait à peine 50 lignées iPSCs différentes. Par conséquent, il est plus réaliste de penser que les banques iPSC seront utilisées pour traiter les patients avec des cellules iPSCs correspondant à un donneur compatible plutôt qu'avec des iPSCs provenant de cellules autologues.

Bien que les cellules iPSCs recèlent un potentiel considérable pour faire avancer la médecine régénérative, les études à leur sujet sont toujours en cours. Il convient de répondre aux préoccupations majeures avant de pouvoir envisager leur utilisation dans des protocoles cliniques. Leur coût, leur instabilité génomique, leur grande capacité de prolifération et leur pluripotence favorisent la formation de tumeurs *in vivo* et, en tant que telles, constituent des facteurs limitants fondamentaux à l'utilisation des cellules iPSCs.

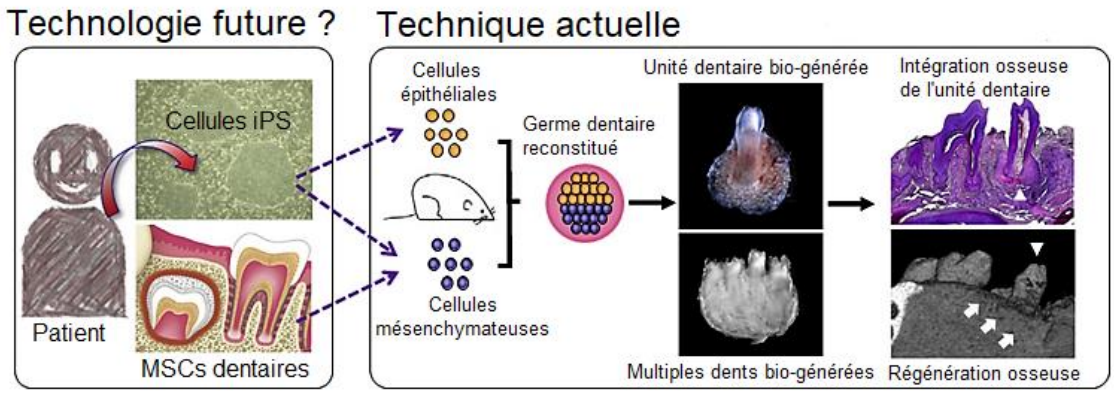

Figure 63 : Représentation schématique de la stratégie de régénération actuelle pour le remplacement des dents/organes matures. Les progrès récents de la biotechnologie ont permis le développement d'une unité dentaire par génie tissulaire (dent entourée de tissus parodontaux) et de multiples unités dentaires associées issues de cellules épithéliales et de cellules mésenchymateuses isolées à partir de germes de la souris. Lors de la transplantation, l'unité dentaire (flèche) a été greffée dans le défaut osseux alvéolaire de la souris receveuse via une intégration osseuse, ce qui a entraîné une formation osseuse verticale (flèches). La future technologie des cellules souches pourrait permettre la mise au point d'unités dentaires créées par génie biologique utilisant des cellules iPSCs dérivées du patient ou des cellules souches/stromales mésenchymateuses (MSC). (Source : Egusa & al, 2012)

2.2 **Faisabilité et pertinence de la technique**

2.2.1 Développement à grande échelle, éthique et réalité financière

La génération de dents entières par ingénierie tissulaire pose encore des problèmes majeurs de faisabilité qui prendront beaucoup de temps à se résoudre.

Tout d'abord, la dernière étape des protocoles expérimentaux avant une possible application clinique, est celle des essais sur l'Homme.

Or, des essais cliniques comportant des risques intrinsèques et un coût élevé peuvent être justifiés pour des maladies potentiellement mortelles que la médecine actuelle juge incurables, telles que la maladie de Parkinson, le diabète ou des lésions de la moelle épinière, mais probablement pas pour la régénération dentaire. (Mao & al, 2012)

De plus, les coûts du processus de commercialisation et les difficultés d'approbation réglementaire associés à la manipulation de cellules *ex vivo* ont exclu tout effort de traduction clinique à ce jour dans la régénération dentaire. Comme dans l'ingénierie tissulaire d'autres structures biologiques, la régénération d'une dent entière ou de diverses structures par implantation de cellules se heurte à de nombreuses difficultés scientifiques, de traduction à l'Homme et de régulation. (Yildirim & al, 2011)

Enfin, le développement à grande échelle de ces techniques nécessitera la création d'infrastructures rodées et compétentes (banques de cellules souches et laboratoires de culture spécifiques) qui n'existent pas à l'heure actuelle. Seule la levée de tous ces verrous permettra d'aborder des expérimentations en toute sécurité chez l'Homme. (Sari, 2014)

2.2.2 Efficacité des solutions alternatives déjà existantes

Il est également pertinent de se poser la question de l'intérêt de la mise au point d'une telle technique dans notre pratique. Il existe, en effet, plusieurs solutions alternatives déjà utilisées cliniquement, moins contraignantes et moins coûteuses.

Actuellement, on peut citer trois moyens de remplacer une dent manquante : la prothèse dentaire conventionnelle (amovible ou fixée), la prothèse implantaire (implanto-stabilisée ou implanto-portée) et l'auto-transplantation. Chaque technique a ses limites.

- Prothèse dentaire conventionnelle :

- La prothèse amovible : elle est peu coûteuse et rapide à mettre en œuvre. Cependant elle peut entrainer une fragilisation des tissus, des problèmes parodontaux ainsi que des ulcérations gingivales. Elle est également la cause de problèmes d'élocution, de mastication qui accentue le manque de confort d'un tel dispositif. (Bégin & Fouilloux, 2005)
- La prothèse fixée plurale ou *bridge* : elle constitue une solution fixe, fonctionnelle et confortable. Cependant, cette solution ne s'applique qu'à des cas précis avec des dents-support idéales, solides et sans nécessité de délabrement inutile. De plus, le *bridge* peut provoquer une résorption osseuse et les dents sont interdépendantes des facteurs de dégradation. (Walter, 2016) Les *bridges* collés quant à eux sont sujets à des décollements fréquents et peuvent créer des sensibilités. (Morgan & al, 2001)

- Prothèse supra-implantaire :

Les progrès technologiques ont modifié notre philosophie en matière de réhabilitation d'un édentement unitaire. Dans bien des cas, l'implant unique est le traitement de choix car il donne de très bons résultats à longue échéance sur les plans esthétique et fonctionnel. (Hebel & al, 2000) Néanmoins, les contre-indications générales à l'implantologie s'ajoutant à certaines limites anatomiques ne permettent pas une application universelle de cette technique. L'implant a également comme défaut fondamental l'absence de ligament alvéolo-dentaire associé à une forme cylindrique artificielle et à l'absence de proprioception et de déplacement possible.

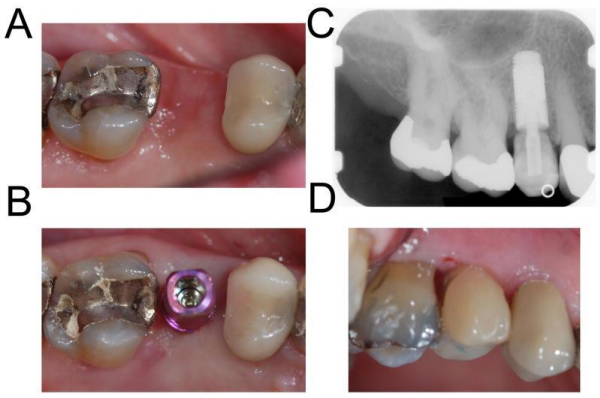

Figure 64 : Réhabilitation prothétique d'un édentement unitaire grâce à un implant en titane immédiatement mis en fonction à l'aide d'un pilier provisoire vissé et d'une couronne en résine composite bisacryl. (Source : Bencharit & al, 2014)

Ce sont ces lacunes qui ont conduit à la recherche d'autres alternatives. (Huang & al, 2009)

- Autotransplantation :

La technique est relativement peu utilisée puisqu'elle implique que le sujet réunisse un grand nombre de critères (dent saine, immature, de taille adaptée, etc...) (Nimcenko & al, 2013)

Figure 65 : Autotransplantation de la dent 38 immature dans la zone de 36 édentée (Source : Sévigny & al, 2008)

Ainsi, le chirurgien-dentiste possède aujourd'hui un arsenal thérapeutique qui répond de manière satisfaisante à la prise en charge de la quasi-totalité des cas d'édentement rencontrés.

L’approche régénérative, elle, vise à s’affranchir des défauts et limites des solutions traditionnelles, en proposant une réhabilitation dentaire qui s’approcherait de façon idéale au plus près de la dent naturelle préexistante du patient. Reste à déterminer si le bénéfice thérapeutique est à la hauteur du coût et de l’ampleur du processus de mise en œuvre et du développement à grande échelle qu’une telle avancée impliquerait.

La thérapie régénérative dentaire est à présent considérée comme un modèle d'étude fondamental pour les thérapies régénératives de remplacement à venir, pouvant être appliquée à des organes plus complexes, et apportant une contribution substantielle au savoir et à la technologie nécessaire à la régénération d'organes. Dans l’ensemble, bien que de nombreux problèmes attendent d’être résolus, des progrès rapides dans l’étude moléculaire de la biologie et du développement de la dent, grâce aux nouvelles technologies à haut débit, faciliteront la réalisation de dents implantables issues de la bio-ingénierie. (Jamal, 2016)

Conclusion

Le terme d'Ingénierie tissulaire a été présenté pour la première fois à la grande communauté scientifique en 1993 par Langer et Vacanti. Leur objectif résidait dans le développement de substituts biologiques qui maintiennent, améliorent ou restaurent la fonction tissulaire.

L'ingénierie tissulaire permettrait donc de contourner les problèmes liés aux dommages aux tissus, traités actuellement avec des greffes, des dispositifs mécaniques ou des reconstructions chirurgicales. Ces trois approches médicales ont sauvé et amélioré la vie d'innombrables patients, mais présentent de nombreux problèmes associés.

Les deux dernières décennies virent se multiplier les recherches concernant la régénération de l'organe dentaire entier. Même si de nombreux verrous persistent, les premiers résultats sont extrêmement prometteurs et les avancées spectaculaires. Reste à déterminer sous quels délais, les chirurgiens-dentistes seront en mesure de proposer la technologie régénérative de la dent entière comme perspective de traitement à leurs patients.

Les avancées dans le domaine de la régénération de petits organes, tels que la dent, le follicule pileux, ou les glandes salivaires, ont ouvert la porte à de nouveaux projets de recherche plus ambitieux.

La médecine actuelle est confrontée à un souci grandissant de pénurie d'organes alors que le nombre de patients en attente ne fait qu'augmenter. Les chercheurs s'attèlent à trouver des solutions alternatives afin de pallier ce problème de santé publique. Certaines équipes se sont orientées vers la création d'organes artificiels, se concrétisant même en 2016 par la première greffe d'un cœur artificiel.

D’autres recherches ont décidé d’appliquer la technologie régénérative à la construction d’organes plus complexes qui s’inspirent des avancées citées précédemment.

En avril 2019, des chercheurs de l’Université de Tel Aviv ont réussi à imprimer en trois dimensions un cœur de lapin à partir de cellules souches d’origine humaine. Les scientifiques ont réussi à vasculariser ces cœurs créés par ingénierie tissulaire ; la prochaine étape de transplantation de tels organes nous permettra d’évaluer l’ampleur des possibilités d’évolution de la médecine générative dans la génération d’organes entiers. (Jee, 2019)

Bibliographie

Références bibliographiques

1. Aguilar P, Lertchirakarn V. Comparison of stem cell behaviors between indigenous high and low-CD24 percentage expressing cells of stem cells from apical papilla (SCAPs). Tissue Cell. 2016; 48(5): 397-406.

2. Alsberg E, Hill EE, Mooney DJ. Craniofacial Tissue Engineering. Crit Rev Oral Biol Med. 2001; 12(1): 64-85.

3. Angelova Volponi A, Kawasaki M, Sharpe PT. Adult Human Gingival Epithelial Cells as a Source for Whole-tooth Bioengineering. J Dent Res. 2013; 92(4): 329-34.

4. Antony-Debré I, Hamidi S, Norol F, Vainchenker W, Raslova H. Cellules souches pluripotentes induites : de l'historique à l'application. Hématologie. 2013 ; 19(1) : 20-32.

5. Atala A. Tissue engineering, stem cells and cloning: current concepts and changing trends. Expert Opin Biol Ther. 2005; 5(7): 879-92.

6. Attias F. Les cellules souches bucco-dentaires : prélèvement, culture et possibilités thérapeutiques [Thèse d'exercice]. [Nice] : Université de Nice. Faculté de chirurgie dentaire ; 2016. 70 p.

7. Basu J, Ludlow JW. Organ Regeneration: Methods and Protocols. New York: Humana Press; 2013. 377 p.

8. Batouli S, Miura M, Brahim J, Tsutsui TW, Fisher LW, Gronthos S, et coll. Comparison of stem-cell-mediated osteogenesis and dentinogenesis. J Dent Res. 2003; 82(12): 976-81.

9. Baust JG, Gao D, Baust JM. Cryopreservation: an emerging paradigm change. Organogenesis. 2009; 5(3): 90-6.

10. Bécavin T. Développement d'implants actifs et nanostructurés à des fins de régénération dentaire [Thèse]. [Lille] : Université de Lille. Ecole doctorale biologie et santé ; 2015 ; 140 p.

11. Bégin M, Fouilloux I. La prothèse partielle amovible. Paris : Quintessence International; 2004. 135 p.

12. Bei M. Molecular genetics of tooth development. Curr Opin Genet Dev. 2009; 19(5): 504-10.

13. Bélime A. Hydrogels injectables à base d'acide hyaluronique comme nouveaux biomatériaux pour la reconstruction osseuse. Synthèse et caractérisations [Thèse]. [Grenoble] : Université de Grenoble. Ecole Doctorale de chimie et sciences du vivant ; 2013. 155 p.

14. Bencharit S, Byrd WC, Altarawneh S, Hosseini B, Leong A, Reside G, et coll. Development and Applications of Porous Tantalum Trabecular Metal Enhanced Titanium Dental Implants. Clin Implant Dent Relat Res. 2014; 16(6): 817-26.

15. Bhanja A, D'Souza DSJ. Mapping the milestones in tooth regeneration: Current trends and future research. Med J Armed Forces India. 2016; 72(Suppl 1): S24-30.

16. Bluteau G, Luder HU, De Bari C, Mitsiadis TA. Stem cells for tooth engineering. Eur Cell Mater. 2008; 16(1): 1-9.

17. Bojic S, Volarevic V, Ljujic B, Stojkovic M. Dental stem cells--characteristics and potential. Histol Histopathol. 2014; 29(6): 699-706.

18. Botelho J, Cavacas MA, Machado V, Mendes JJ. Dental stem cells: recent progresses in tissue engineering and regenerative medicine. Ann Med. 2017; 49(8): 644-51.

19. Cai J, Zhang Y, Liu P, Chen S, Wu X, Sun Y, et coll. Generation of tooth-like structures from integration-free human urine induced pluripotent stem cells. Cell Regen (Lond). 2013; 2(1): 6.

20. Caplan AI. Adult mesenchymal stem cells for tissue engineering versus regenerative medicine. J Cell Physiol. 2007; 213(2): 341-7.

21. Casabona R, Maria C. The legal question of the obtention of human stem cells for biomedical research. Legislation policy considerations. Rev Derecho Genoma Hum. 2006; 24(1): 75-125.

22. Catón J, Tucker AS. Current knowledge of tooth development : patterning and mineralization of the murine dentition. J Anat. 2009; 214(4): 502-15.

23. Cavazzana-Calvo M, Lagresle C, André-Schmutz I, Hacein-Bey-Abina S. Moelle osseuse : réservoir de cellules souches réparatrices de différents tissus ? Ann Biol Clin. 2004; 62(2): 8.

24. Chapekar MS, Gunter KC. FDA regulations for growth factors and related products. EXS. 1992; 61: 471-8.

25. Choi S, Cho T-J, Kwon S-K, Lee G, Cho J. Chondrogenesis of periodontal ligament stem cells by transforming growth factor-β3 and bone morphogenetic protein-6 in a normal healthy impacted third molar. Int J Oral Sci. 2013; 5(1): 7-13.

26. Consolaro A. Orthodontic traction : possible consequences for maxillary canines and adjacent teeth. Dental Press J Orthod. 2010; 15(4): 15-23.

27. Cuisinier R. L'utilisation des cellules souches dentaires : une avancée médicale à fort potentiel ? [Thèse]. [Strasbourg] : Université de Strasbourg. Faculté de chirurgie dentaire ; 2016. 87 p.

28. Duailibi MT, Duailibi SE, Young CS, Bartlett JD, Vacanti JP, Yelick PC. Bioengineered teeth from cultured rat tooth bud cells. J Dent Res. 2004; 83(7): 523-8.

29. Duailibi SE, Duailibi MT, Vacanti JP, Yelick PC. Prospects for tooth regeneration. Periodontol 2000. 2006; 41(1): 177-87.

30. Duailibi SE, Duailibi MT, Zhang W, Asrican R, Vacanti JP, Yelick PC. Bioengineered dental tissues grown in the rat jaw. J Dent Res. 2008; 87(8): 745-50.

31. Egusa H, Sonoyama W, Nishimura M, Atsuta I, Akiyama K. Stem cells in dentistry--part I : stem cell sources. J Prosthodont Res. juill 2012; 56(3): 151-65.

32. Egusa H, Sonoyama W, Nishimura M, Atsuta I, Akiyama K. Stem cells in dentistry--Part II : Clinical applications. J Prosthodont Res. 2012; 56(4): 229-48.

33. Estrela C, Alencar AHG de, Kitten GT, Vencio EF, Gava E. Mesenchymal stem cells in the dental tissues: perspectives for tissue regeneration. Braz Dent J. 2011; 22(2): 91-8.

34. Fagniez P-L. Cellules souches et choix éthiques. Paris : La documentation francaise ; 2016. 242 p.

35. Faulk DM, Johnson SA, Zhang L, Badylak SF. Role of the extracellular matrix in whole organ engineering. J Cell Physiol. 2014; 229(8): 984-9.

36. Foty R. A Simple Hanging Drop Cell Culture Protocol for Generation of 3D Spheroids. J Vis Exp. 2011; 51(51). 1-5.

37. Fukumoto S, Yamada Y. Review: extracellular matrix regulates tooth morphogenesis. Connect Tissue Res. 2005; 46(4-5): 220-6.

38. Gastard Y. Gestion esthétique en Classe III. Fil dent. 2012 ; 70(1) : 18-20.

39. Gras P. Physico-chemical and structural study of hydrated calcium pyrophosphates: application to microcalcifications associated with arthritis [Thèse de doctorat]. [Toulouse] : Institut National Polytechnique de Toulouse ; 2014. 290 p.

40. Goldberg M, Kellermann O, Dimitrova-Nakov S, Harichane Y, Baudry A. Comparative studies between mice molars and incisors are required to draw an overview of enamel structural complexity. Front Physiol. 2014; 5(5): 359.

41. Guignot F. Cryoconservation des embryons des espèces domestiques. Inra Prod Anim. 2005 ; 18(1) : 27-35.

42. Gupte MJ, Ma PX. Nanofibrous Scaffolds for Dental and Craniofacial Applications. J Dent Res. 2012; 91(3): 227-34.

43. Hildebrand C, Fried K, Tuisku F, Johansson CS. Teeth and tooth nerves. Prog Neurobiol. 1995; 45(3): 165-222.

44. Hirayama M, Oshima M, Tsuji T. Development and prospects of organ replacement regenerative therapy. Cornea. 2013; 32(Suppl 1): S13-21.

45. Hollands P, Aboyeji D, Orcharton M. Dental pulp stem cells in regenerative medicine. Br Dent J. 2018; 224(9): 747-50.

46. Honda MJ, Fong H, Iwatsuki S, Sumita Y, Sarikaya M. Tooth-forming potential in embryonic and postnatal tooth bud cells. Med Mol Morphol. 2008 ; 41(4) : 183-92.

47. Hu B, Nadiri A, Kuchler-Bopp S, Perrin-Schmitt F, Peters H, Lesot H. Tissue engineering of tooth crown, root, and periodontium. Tissue Eng. 2006;12(8): 2069-75.

48. Huang GT-J, Gronthos S, Shi S. Mesenchymal stem cells derived from dental tissues vs. those from other sources : their biology and role in regenerative medicine. J Dent Res. 2009; 88(9): 792-806.

49. Huang GTJ, Thesleff I. Stem Cells in Craniofacial Development and Regeneration. Hoboken: John Wiley & Sons; 2013. 715 p.

50. Hynes K, Menichanin D, Bright R, Ivanovski S, Hutmacher DW, Gronthos S, et coll. Induced Pluripotent Stem Cells : A New Frontier for Stem Cells in Dentistry. J Dent Res. 2015; 94(11): 1508-15.

51. Hynes K, Gronthos S, Bartold PM. iPSC for Dental Tissue Regeneration. Curr Oral Health Rep. 2014; 1(1): 9-15.

52. Ikeda E, Morita R, Nakao K, Ishida K, Nakamura T, Takano-Yamamoto T, et coll. Fully functional bioengineered tooth replacement as an organ replacement therapy. Proc Natl Acad Sci USA. 2009; 106(32): 13475-80.

53. Ikeda E, Tsuji T. Growing bioengineered teeth from single cells: potential for dental regenerative medicine. Expert Opin Biol Ther. 2008; 8(6): 735-44.

54. Inanç B, Elçin YM. Stem cells in tooth tissue regeneration--challenges and limitations. Stem Cell Rev. 2011; 7(3): 683-92.

55. Ishida K, Oshima M, Tsuji T. Tooth tissue and organ regeneration using stem cells. Inflamm and Regen. 2013; 33(1): 29-37.

56. Jamal H. Tooth Organ Bioengineering : Cell Sources and Innovative Approaches. Dent J. 2016; 4(2): 18.

57. Jernvall J, Thesleff I. Reiterative signaling and patterning during mammalian tooth morphogenesis. Mech Dev. 2000; 92(1): 19-29.

58. Jheon AH, Seidel K, Biehs B, Klein OD. From molecules to mastication : the development and evolution of teeth : The development and evolution of teeth. Wiley Interdiscip Rev Dev Biol. 2013; 2(2): 165-82.

59. Jussila M, Juuri E, Thesleff I. Tooth Morphogenesis and Renewal. Dans : Huang GT-J, Thesleff I, éditeurs. Stem Cells in Craniofacial Development and Regeneration. Hoboken: John Wiley & Sons, Inc.; 2013. p. 109-34.

60. Kasper C, Witte F, Pörtner R. Tissue Engineering III: Cell - Surface Interactions for Tissue Culture. Berlin: Springer; 2012. 349 p.

61. Kaukua N, Shahidi MK, Konstantinidou C, Dyachuk V, Kaucka M, Furlan A, et coll. Glial origin of mesenchymal stem cells in a tooth model system. Nature. 2014; 513(7519): 551-4.

62. Keller L. Ressources cellulaires mésenchymateuses pour l'ingénierie de l'organe dentaire [Thèse de doctorat]. [Strasbourg] : Université de Strasbourg ; 2012. 291 p.

63. Khademhosseini A, Camci-Unal G. 3D Bioprinting in Regenerative Engineering : Principles and Applications. Boca Raton: CRC Press; 2018. 300 p.

64. Khan D, Kleinfeld C, Winter M, Tobiasch E. Oral Tissues as Source for Bone Regeneration in Dental Implantology. Dans : Davies J. Tissue regeneration: from basic biology to clinical applications. Edinburgh : Editions InTechOpen; 2012: 325-38.

65. Kim K, Lee CH, Kim BK, Mao JJ. Anatomically shaped tooth and periodontal regeneration by cell homing. J Dent Res. 2010; 89(8): 842-7.

66. Kirouac DC, Madlambayan GJ, Yu M, Sykes EA, Ito C, Zandstra PW. Cell–cell interaction networks regulate blood stem and progenitor cell fate. Mol Syst Biol. 2009; 5(1): 293.

67. Kökten T, Bécavin T, Keller L, Weickert J-L, Kuchler-Bopp S, Lesot H et coll. Immunomodulation stimulates the innervation of engineered tooth organ. PLoS ONE. 2014; 9(1): 1-12.

68. Koutsopoulos S. Peptide Applications in Biomedicine, Biotechnology and Bioengineering. Amsterdam: Elsevier; 2018. 656 p.

69. Kuchler-Bopp S, Larrea A, Petry L, Idoux-Gillet Y, Sebastian V, Ferrandon A, et coll. Promoting bioengineered tooth innervation using nanostructured and hybrid scaffolds. Acta Biomater. 2017; 50(1): 493-501.

70. Kunimatsu R, Nakajima K, Tetsuya A, Tsuka Y, Abe T, Ando K, et coll. Comparative characterization of stem cells from human exfoliated deciduous teeth, dental pulp, and bone marrow-derived mesenchymal stem cells. Biochem Biophys Res Commun. 2018; 501(1): 193-8.

71. Kyle S, Aggeli A, Ingham E, McPherson MJ. Recombinant self-assembling peptides as biomaterials for tissue engineering. Biomaterials. 2010; 31(36): 9395-405.

72. Labbé C. Stress subi par les cellules au cours de la congélation-décongélation et méthodes de cryoconservation. STAL. 2018 ; 39(1) : 15-20.

73. Langer RS, Vacanti JP. Tissue engineering : the challenges ahead. Sci Am. 1999; 280(4): 86-9.

74. Lee M-J, Kim E-J, Otsu K, Harada H, Jung H-S. Sox2 contributes to tooth development via Wnt signaling. Cell Tissue Res. 2016; 365(1): 77-84.

75. Leroy C. Oxalates de calcium et hydroxyapatite : des matériaux synthétiques et naturels étudiés par techniques RMN et DNP [Thèse de doctorat]. [Paris]: Université Pierre et Marie Curie Paris VI; 2017. 263 p.

76. Lo B, Parham L. Ethical Issues in Stem Cell Research. Endocr Rev. 2009; 30(3): 204-13.

77. Lu J, Hao Y, Zhao W, Lyu C, Zou D. Molecular, Cellular and Pharmaceutical Aspects of Autologous Grafts for Peri-implant Hard and Soft Tissue Defects. Curr Pharm Biotechnol. 2017; 18(1): 85-94.

78. Malhotra N. Induced Pluripotent Stem (iPS) Cells in Dentistry : A Review. Int J Stem Cells. 2016; 9(2): 176-85.

79. Mantesso A, Sharpe P. Dental stem cells for tooth regeneration and repair. Expert Opin Biol Ther. 2009; 9(9): 1143-54.

80. Mao JJ, Robey PG, Prockop DJ. Stem cells in the face : tooth regeneration and beyond. Cell Stem Cell. 2012; 11(3): 291-301.

81. Marchesan J, Girnary MS, Jing L, Miao MZ, Zhang S, Sun L, et coll. An experimental murine model to study periodontitis. Nat Protoc. 2018;13(10): 2247-67.

82. Maria OM, Khosravi R, Mezey E, Tran SD. Cells from bone marrow that evolve into oral tissues and their clinical applications. Oral Dis. 2007; 13(1): 11-6.

83. Marx V. Tissue engineering: Organs from the lab. Nature. 2015; 522(7556): 373-7.

84. McCulloch CA. Progenitor cell populations in the periodontal ligament of mice. Anat Rec. 1985; 211(3): 258-62.

85. Monsees T, Azem F, Cotrut MC, Braic M, Abdulgader R, Pana I, et coll. Biodegradable Ceramics Consisting of Hydroxyapatite for Orthopaedic Implants. Coatings. 2017; 7(11): 184.

86. Morgan C, Djemal S, Gilmour G. Predictable resin-bonded bridges in general dental practice. Dent Update. 2001; 28(10): 501-6, 508.

87. Mortada I, Mortada R, Al Bazzal M. Dental Pulp Stem Cells and Neurogenesis. Adv Exp Med Biol. 2018; 1083(1): 63-75.

88. Munévar JC, Gutiérrez N, Jiménez NT, Lafaurie GI. Evaluation of two human dental pulp stem cell cryopreservation methods. Acta Odontol Latinoam. 2015; 28(2): 114-21.

89. Naharro M. Perte partielle ou totale des dents : une revue de littérature sur la prévalence et l'incidence en Europe [Thèse]. [Genève] : Faculté de Médecine de l'Université de Genève ; 2008. 69 p.

90. Nait Lechger A. Ingénierie de l'organe dentaire à partir de cellules dissociées : morphogenèse coronaire, vascularisation et innervation [Thèse]. [Strasbourg] : Université de Strasbourg. Faculté des Sciences de la vie ; 2010. 153 p.

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

92. Nait Lechguer A, Kuchler-Bopp S, Lesot H. Crown formation during tooth development and tissue engineering. J Exp Zool B Mol Dev Evol. 2009; 312B(5): 399-407.

93. Nakajima K, Oshima M, Tsuji T. Whole Tooth Regenerative Therapy Using a Bioengineered Tooth Germ. Curr Oral Health Rep. 2014; 1(1): 43-9.

94. Nakamura S, Yamada Y, Katagiri W, Sugito T, Ito K, Ueda M. Stem cell proliferation pathways comparison between human exfoliated deciduous teeth and dental pulp stem cells by gene expression profile from promising dental pulp. J Endod. 2009; 35(11): 1536-42.

95. Nakao K, Morita R, Saji Y, Ishida K, Tomita Y, Ogawa M, et coll. The development of a bioengineered organ germ method. Nat Methods. 2007; 4(3): 227-30.

96. Nakao K, Murofushi M, Ogawa M, Tsuji T. Regulations of size and shape of the bioengineered tooth by a cell manipulation method. Dans : 2009 International Symposium on Micro-NanoMechatronics and Human Science. Nagoya, Japan: IEEE; 2009. p. 123-6.

97. Nakao K, Tsuji T. Dental regenerative therapy: Stem cell transplantation and bioengineered tooth replacement. Jpn Dent Sci Rev. 2008; 44(1): 70-5.

98. Newman SA, Müller GB. Epigenetic mechanisms of character origination. J Exp Zool. 2000; 288(4): 304-17.

99. Nimčenko T, Omerca G, Varinauskas V, Bramanti E, Signorino F, Cicciù M. Tooth auto-transplantation as an alternative treatment option : A literature review. Dent Res J (Isfahan). 2013; 10(1): 1-6.

100. Obara N, Lesot H. Subcellular localization of beta-catenin and cadherin expression in the cap-stage enamel organ of the mouse molar. Histochem Cell Biol. 2004; 121(4): 351-8.

101. Ock S-A, Rho G-J. Effect of dimethyl sulfoxide (DMSO) on cryopreservation of porcine mesenchymal stem cells (pMSCs). Cell Transplant. 2011; 20(8): 1231-9.

102. Ohazama A, Modino S a. C, Miletich I, Sharpe PT. Stem-cell-based tissue engineering of murine teeth. J Dent Res. 2004; 83(7): 518-22.

103. Okita K, Matsumura Y, Sato Y, Okada A, Morizane A, Okamoto S, et coll. A more efficient method to generate integration-free human iPS cells. Nat Methods. 2011; 8(5): 409-12.

104. Ono M, Oshima M, Ogawa M, Sonoyama W, Hara ES, Oida Y, et coll. Practical whole-tooth restoration utilizing autologous bioengineered tooth germ transplantation in a postnatal canine model. Sci Rep. 2017; 7: 44522.

105. Orsini G, Jimenez-Rojo L, Natsiou D, Putignano A, Mitsiadis TA. In vivo administration of dental epithelial stem cells at the apical end of the mouse incisor. Front Physiol. 2015; 6(1): 112.

106. Oshima M, Mizuno M, Imamura A, Ogawa M, Yasukawa M, Yamazaki H, et coll. Functional tooth regeneration using a bioengineered tooth unit as a mature organ replacement regenerative therapy. PLoS ONE. 2011; 6(7): 215-31.

107. Oshima M, Ogawa M, Tsuji T. Functional Tooth Regeneration. Methods Mol Biol. 2017; 1597(1): 97-116.

108. Oshima M, Ogawa M, Tsuji T. Regeneration of complex oral organs using 3D cell organization technology. Curr Opin Cell Biol. 2017; 49(1): 84-90.

109. Oshima M, Ogawa M, Yasukawa M, Tsuji T. Generation of a Bioengineered Tooth by Using a Three-Dimensional Cell Manipulation Method (Organ Germ Method). Dans : Kioussi C, éditeur. Odontogenesis : Methods and Protocols. Totowa, NJ: Humana Press; 2012. p. 149-65.

110. Oshima M, Tsuji T. Functional tooth regenerative therapy : tooth tissue regeneration and whole-tooth replacement. Odontology. 2014; 102(2): 123-36.

111. Oshima M, Tsuji T. Whole Tooth Regeneration as a Future Dental Treatment. Adv Exp Med Biol. 2015; 881(1): 255-69.

112. Otsu K, Kumakami-Sakano M, Fujiwara N, Kikuchi K, Keller L, Lesot H, et coll. Stem cell sources for tooth regeneration: current status and future prospects. Front Physiol. 2014 ; 5(1): 36-45.

113. Ozbolat IT, Yu Y. Bioprinting toward organ fabrication : challenges and future trends. IEEE Trans Biomed Eng. 2013; 60(3): 691-9.

114. Ozturk SS. Engineering challenges in high density cell culture systems. Cytotechnology. 1996; 22(1-3): 3-16.

115. Pan Z, Ding J. Poly(lactide-co-glycolide) porous scaffolds for tissue engineering and regenerative medicine. Interface Focus. 2012; 2(3): 366-77.

116. Pereira RF, Bártolo PJ. 3D Photo-Fabrication for Tissue Engineering and Drug Delivery. Engineering. 2015; 1(1): 90-112.

117. Prateeptongkum E, Klingelhöffer C, Morsczeck C. The influence of the donor on dental apical papilla stem cell properties. Tissue Cell. 2015; 47(4): 382-8.

118. Puri M, Morar-Mitrica S, Crotts G, Nesta D. Evaluating Freeze–Thaw Processes in Biopharmaceutical Development. BioPrecess Int. 2015; 13(1): 8-15.

119. Ramier J. Structures poreuses tridimensionnelles de biopolymères pour l'ingénierie tissulaire [Thèse de doctorat]. [Paris] : Université de Paris Est. Ecole doctorale Sciences, Ingénierie et Environnement : 2012 ; 227 p.

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

121. Renard E. Les cellules souches et la pulpe dentaire [Thèse]. [Nantes]: Université de Nantes. Faculté de chirurgie dentaire; 2005. 78 p.

122. Reppel L, Caunday O, Bultel S, Stoltz J-F, Huselstein C, Bensoussan D. Stem cells and new french bioethics law. Hématologie. 2012; 18(3): 175–181.

123. Rocchi L. Utilisation du Polyetheretherketone en implantologie dentaire [Thèse]. [Nancy]: Université de Lorraine. Faculté d'odontologie; 2016. 159 p.

124. Salazar-Ciudad I, Jernvall J. A gene network model accounting for development and evolution of mammalian teeth. Proc Natl Acad Sci USA. 2002; 99(12): 8116-20.

125. Salma M. Utilisation de la cryoconservation pour la conservation et la production de cultures in vitro de palmier dattier [Thèse]. [Montpellier]: Université de Montpellier. Faculté de sciences du vivant; 2015. 191 p.

126. Sari M. La reconstruction de l'organe dentaire par ingénierie tissulaire : nouvelle perspective thérapeutique ? [Thèse]. [Nantes] : Université de Nantes. Faculté de Chirurgie dentaire ; 2014. 97 p.

127. Sasai Y. Next-generation regenerative medicine: organogenesis from stem cells in 3D culture. Cell Stem Cell. 2013;12(5): 520-30.

128. Scheller EL, Krebsbach PH, Kohn DH. Tissue engineering : state of the art in oral rehabilitation. J Oral Rehabil. 2009; 36(5): 368-89.

129. Schmidt MM, Dornelles RCP, Mello R, Kubota EH, Mazutti M et coll. Collagen extraction process. Int Food Res J. 2016; 23(3): 913-22.

130. Schulze M, Tobiasch E. Artificial scaffolds and mesenchymal stem cells for hard tissues. Adv Biochem Eng Biotechnol. 2012; 126(1): 153-94.

131. Sedgley CM, Botero TM. Dental stem cells and their sources. Dent Clin North Am. 2012; 56(3): 549-61.

132. Semino C. Current Applications of Tissue Engineering in Biomedicine. J Bioengin Bioelect. 2013; 3(2): 1-14.

133. Seo B-M, Miura M, Gronthos S, Bartold PM, Batouli S, Brahim J, et coll. Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament. Lancet. 2004; 364(9429): 149-55.

134. Shao H, Sun M, Zhang F, Liu A, He Y, Fu J, et coll. Custom Repair of Mandibular Bone Defects with 3D Printed Bioceramic Scaffolds. J Dent Res. 2018; 97(1): 68-76.

135. Sharma S, Srivastava D, Grover S, Sharma V. Biomaterials in Tooth Tissue Engineering : A Review. J Clin Diagn Res. 2014; 8(1): 309-15.

136. Sharpe HJ, Stevens TJ, Munro S. A comprehensive comparison of transmembrane domains reveals organelle-specific properties. Cell. 2010; 142(1): 158-69.

137. Sharpe PT. Dental mesenchymal stem cells. Development. 2016; 143(13): 2273-80.

138. Shi S, Bartold PM, Miura M, Seo BM, Robey PG, Gronthos S. The efficacy of mesenchymal stem cells to regenerate and repair dental structures. Orthod Craniofac Res. 2005; 8(3): 191-9.

139. Shuai C, Wu P, Zhong Y, Feng P, Gao C, Huang W, et coll. Polyetheretherketone/poly (glycolic acid) blend scaffolds with biodegradable properties. J Biomater Sci Polym Ed. 2016; 27(14): 1434-46.

140. Smith EE, Yelick PC. Progress in Bioengineered Whole Tooth Research: From Bench to Dental Patient Chair. Curr Oral Health Rep. 2016; 3(4): 302-8.

141. Sonoyama W, Liu Y, Fang D, Yamaza T, Seo B-M, Zhang C, et coll. Mesenchymal Stem Cell-Mediated Functional Tooth Regeneration in Swine. PLoS One. 2006; 1(1): 469-79.

142. Srijaya TC, Pradeep PJ, Zain RB, Musa S, Abu Kasim NH, Govindasamy V. The Promise of Human Induced Pluripotent Stem Cells in Dental Research. Stem Cells Int. 2012(1); 2012: 1-10.

143. Strub M, Keller L, Idoux-Gillet Y, Lesot H, Clauss F, Benkirane-Jessel N, et coll. Bone Marrow Stromal Cells Promote Innervation of Bioengineered Teeth. J Dent Res. 2018; 97(10): 1152-9.

144. Sumita Y, Honda MJ, Ohara T, Tsuchiya S, Sagara H, Kagami H, et coll. Performance of collagen sponge as a 3-D scaffold for tooth-tissue engineering. Biomaterials. 2006; 27(17): 3238-48.

145. Sunil PM. Induced pluripotent stem cells in dentistry. J Pharm Bioallied Sci. 2016; 8(Suppl 1): S23-7.

146. Sveen OB, Hawes RR. Differentiation of new odontoblasts and dentine bridge formation in rat molar teeth after tooth grinding. Arch Oral Biol. 1968; 13(12): 1399-409.

147. Takahashi K, Okita K, Nakagawa M, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from fibroblast cultures. Nat Protoc. 2007; 2(12): 3081-9.

148. Tatullo M, Marrelli M, Shakesheff KM, White LJ. Dental pulp stem cells : function, isolation and applications in regenerative medicine. J Tissue Eng Regen Med. 2015; 9(11): 1205-16.

149. Trubiani O, Orsini G, Zini N, Di Iorio D, Piccirilli M, Piattelli A, et coll. Regenerative potential of human periodontal ligament derived stem cells on three-dimensional biomaterials : a morphological report. J Biomed Mater Res A. 2008; 87(4): 986-93.

150. Tsuji T. Organ Regeneration: 3D Stem Cell Culture & Manipulation. New York: Springer; 2017. 248 p.

151. Tucker A, Sharpe P. The cutting-edge of mammalian development; how the embryo makes teeth. Nat Rev Genet. 2004; 5(7): 499-508.

152. Tziafas D, Kodonas K. Differentiation potential of dental papilla, dental pulp, and apical papilla progenitor cells. J Endod. 2010; 36(5): 781-9.

153. Varan N. The Use of Titration Technique and FTIR Bands to Determine the Deacetylation Degree of Chitosan Samples. J Text Sci Eng. 2017 ; 7(1): 1-4.

154. Ventola CL. Medical Applications for 3D Printing : Current and Projected Uses. P T. 2014; 39(10): 704-11.

155. Vigier S. Matrices fibrillaires denses de collagène : matériaux pour la réparation osseuse et l'étude d'ostéoblastes en trois dimensions [Thèse de doctorat]. [Paris] : Université Pierre et Marie Curie Paris VI ; 2008. 203 p.

156. Vishwakarma A, Sharpe P, Shi S, Ramalingam M. Stem Cell Biology and Tissue Engineering in Dental Sciences. Amsterdam: Elsevier; 2015. 932 p.

157. Volponi AA, Pang Y, Sharpe PT. Stem cell-based biological tooth repair and regeneration. Trends Cell Biol. 2010; 20(12): 715-22.

158. Walter B, Sailer I, Barthet P, De March P, Dot D, Fages M, et coll. Prothèse fixée : approche clinique. Malakoff: Éditions CdP; 2016. 329 p.

159. Wright N, Alison MR, Forbes SJ, Wright NA. Adult stem cell plasticity. J Pathol. 2002; 197(4): 441-56.

160. Xie Y, Chen Y, Sun M, Ping Q. A mini review of biodegradable calcium phosphate nanoparticles for gene delivery. Curr Pharm Biotechnol. 2013; 14(10): 918-25.

161. Yamamoto H, Kim E-J, Cho S-W, Jung H-S. Analysis of tooth formation by reaggregated dental mesenchyme from mouse embryo. J Electron Microsc (Tokyo). 2003; 52(6): 559-66.

162. Yamanaka S. Induced Pluripotent Stem Cells : Past, Present, and Future. Cell Stem Cell. 2012; 10(6): 678-84.

163. Yang K-C, Kitamura Y, Wu C-C, Chang H-H, Ling T-Y, Kuo T-F. Tooth Germ-Like Construct Transplantation for Whole-Tooth Regeneration: An In Vivo Study in the Miniature Pig. Artif Organs. 2016; 40(4): E39-50.

164. Yeasmin S, Ceccarelli J, Vigen M, Carrion B, Putnam AJ, Tarle SA, et coll. Stem cells derived from tooth periodontal ligament enhance functional angiogenesis by endothelial cells. Tissue Eng Part A. 2014; 20(7-8): 1188-96.

165. Yildirim S, Fu SY, Kim K, Zhou H, Lee CH, Li A, et coll. Tooth regeneration : a revolution in stomatology and evolution in regenerative medicine. Int J Oral Sci. 2011; 3(3): 107-16.

166. Yoshikawa H, Tamai N, Murase T, Myoui A. Interconnected porous hydroxyapatite ceramics for bone tissue engineering. J Royal Soc Interface. 2009; 6(Suppl 3): 341-8.

167. Young CS, Terada S, Vacanti JP, Honda M, Bartlett JD, Yelick PC. Tissue engineering of complex tooth structures on biodegradable polymer scaffolds. J Dent Res. 2002; 81(10): 695-700.

168. Yuan Z, Nie H, Wang S, Lee CH, Li A, Fu SY, et coll. Biomaterial selection for tooth regeneration. Tissue Eng Part B Rev. 2011; 17(5): 373-88.

169. Zhang W, Vazquez B, Oreadi D, Yelick PC. Decellularized Tooth Bud Scaffolds for Tooth Regeneration. J Dent Res. 2017; 96(5): 516-23.

170. Zhang W, Ahluwalia IP, Literman R, Kaplan DL, Yelick PC. Human dental pulp progenitor cell behavior on aqueous and hexafluoroisopropanol based silk scaffolds. J Biomed Mater Res A. 2011; 97(4): 414-22.

171. Zhang YD, Chen Z, Song YQ, Liu C, Chen YP. Making a tooth : growth factors, transcription factors, and stem cells. Cell Res. 2005; 15(5): 301-16.

172. Zhang Y, Chen Y. Bioengineering of a human whole tooth: progress and challenge. Cell Reg. 2014; 3(1): 8.

Références bibliographiques électroniques

173. Bourguignon C. Cellules souches issues de sang de cordon : caractéristiques et applications cliniques [Internet]. 2019 [Consulté le 26 fév 2019]. Disponible sur : https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&ved=2ahUKEwj55df80ITjAhXYDmMBHfESDQAQFjAAegQIARAC&url=http%3A%2F%2Fwww.irmb-inserm.fr%2Fuploads%2F2%2F4%2F0%2F6%2F24061036%2F181106_cours_dr._chlo%25C3%25A9_bourguignon-cs_issues_de_sang_de_cordon.pdf&usg=AOvVaw1ts0BYueYiVQhfctajMI_j

174. Brusselle, Dehaynin. Grossesse et chirurgie dentaire : quelle prise en charge pour nos patientes ? Rappels anatomiques et physiologiques [Internet]. 2017 [consulté le 13 juin 2018]. Disponible sur :

http://chirdent.univ-lille.fr/fileadmin/user_upload/These/2017/Grossesse/co/02_AnatomiePhysiologie.html

175. Coudane J. Implants à suppleance mixte : polyesters dégradables applications temporaires dans le domaine de la santé. Doc Player [Internet]. 2014 [consulté le 13 juin 2018]. Disponible sur : https://docplayer.fr/57120817-Implants-a-suppleance-mixte-polyesters-degradables-applications-temporaires-dans-le-domaine-de-la-sante-jean-coudane.html

176. E-dentaire : ODONTOGENESE [Internet]. 2015 [consulté le 24 juin 2019]. Disponible sur : http://e-dentaire.blogspot.com/2015/06/odontogenese.html

177. Ernenwein D. Implants dentaires : pourquoi la pose d'implant(s) est souvent la meilleure alternative thérapeutique en cas d'édentement unique ou multiple ? [Internet]. 2016 [consulté le 3 févr 2019]. Disponible sur : https://docplayer.fr/16725649-Implants-et-alternatives-solutions-de-rehabilitation-dentaire.html

178. Farges J. Physiopathologie et régénération du complexe pulpodentinaire [Internet]. 2016 [consulté le 19 nov 2018]. Disponible sur : https://lbti.ibcp.fr/?page_id=171

179. Healthinnovations. Researchers successfully implant and innervate bioengineered teeth derived from postnatal cells. [Internet]. 2018 [consulté le 2 déc 2018]. Disponible sur : https://health-innovations.org/2018/08/24/researchers-successfully-implant-and-innervate-bioengineered-teeth-derived-from-postnatal-cells/

180. Hebel K, Gajaar R, Hofstede T. Le remplacement d'une seule dent : le bridge vs la restauration sur implant [Internet]. 2000 [consulté le 9 déc 2018]. Disponible sur : https://www.cda-adc.ca/jadc/vol-66/issue-8/435.html

181. Jee C. A 3D-printed heart with blood vessels has been made using human tissue. MIT Technol Rev [Internet]. 2019 [consulté le 13 juin 2019]. Disponible sur : https://www.technologyreview.com/f/613316/a-3d-printed-heart-with-blood-vessels-has-been-made-using-human-tissue/

182. Jouanneau D. Les phycocolloïdes. Slideplayer [Internet]. 2007 [consulté le 14 nov 2018]. Disponible sur : https://slideplayer.fr/slide/484222/

183. Kamble T. Dental pulp stem cells : Definition |Genetic Engineering Info [Internet]. [consulté le 9 juin 2018]. Disponible sur : https://geneticengineeringinfo.blogspot.com/2013/06/dental-pulp-stem-cells-definition.html
184. Legeai C. Quel type de donneurs en 2014 ? Quelle limite d'âge ? [Internet]. 2014 [consulté le 12 avr 2019]. Disponible sur : https://slideplayer.fr/slide/2714199/
185. Lieff J. Extra Cellular Matrix Is Critical to Neuroplasticity [Internet]. 2013 [consulté le 13 juin 2018]. Disponible sur : http://jonlieffmd.com/blog/extra-cellular-matrix-is-critical-to-neuroplasticity
186. Mauvieux L. Cellules souches et cellules proliférantes, régulation de la différenciation cellulaire [Internet]. 2010 [consulté le 9 juin 2018]. Disponible sur : http://slideplayer.fr/slide/517365/
187. McGowan Institute. What Is Regenerative Medicine ? Regenerative Medicine at the McGowan Institute [Internet]. [consulté le 4 juill 2018].
Disponible sur : http://www.mirm.pitt.edu/about-us/what-is-regenerative-medicine/
188. Montalbano E. 3D Printing Used to Fill in Cranium-Bone Defects Like Tooth Fillings. PlasticsToday [Internet]. 2018 [consulté le 18 oct 2018].
Disponible sur : https://www.plasticstoday.com/materials-assembly/3d-printing-used-fill-cranium-bone-defects-tooth-fillings/20059714158517
189. Moztarzadeh F, Mobasheri H, Kosari E et coll. Researchers Develop Chitosan Hydrogel Intended for Cartilage Tissue Engineering. Isca News [Internet]. 2018 [consulté le 4 nov 2018]. Disponible sur : http://en.iscanews.ir:80/news.aspx?id=615320
190. Najeeb S, Sultan Z, Matinlinna J, Siddiqui F, Nassani MZ, Baroudi K. Nanomodified Peek Dental Implants: Bioactive Composites and Surface Modification—A Review. Int J Dent. 2015 [Internet]. 2015 [consulté le 30 janv 2019]; (1): 1-7. Disponible sur : https://www.hindawi.com/journals/ijd/2015/381759/
191. Nefussi JR. Aspects morphologiques et régulation de l'odontogenèse [Internet]. 2013 [consulté le 25 juin 2019]. Disponible sur : http://spiralconnect.univ-lyon1.fr/spiral-files/download?mode=inline&data=2725662

192. NIH (National Institute of Biomedical Imaging and Bioengineering). Tissue Engineering and Regenerative Medicine [Internet]. 2013 [consulté le 4 juill 2018]. Disponible sur : https://www.nibib.nih.gov/science-education/science-topics/tissue-engineering-and-regenerative-medicine

193. Pedeutour F. Techniques de culture cellulaire appliquées à la cytogénétique [Internet]. 2009 [consulté le 13 juin 2018] Disponible sur : https://slideplayer.fr/slide/10276987/

194. Ryan J. Guide général de cryoconservation de culture de cellules animales [Internet]. 2004 [consulté le 13 juin 2018]. Disponible sur : http://www.labcluster.com/images/Cryoconservation_Corning.pdf

195. Schirmer, Kuczewski M, Golden K, Lain B, Bragg C, Chon J et coll. Primary Clarification of Very High-Density Cell Culture Harvests By Enhanced Cell Settling. Bioprocess Int [Internet]. 2010 [consulté le 14 févr 2019]. Disponible sur : https://bioprocessintl.com/downstream-processing/separation-purification/primary-clarification-of-very-high-density-cell-culture-harvests-by-enhanced-cell-settling-186359/

196. Sévigny L, Rouleau C, Grenier G. Forum : Autotransplantation dentaire. Eugénol [Internet]. 2008 [consulté le 8 févr 2019]. Disponible sur : https://www.eugenol.com/sujets/343063-simple-discussion-la-transplantation

197. Shaheen MA. Barrier function & biomechanical properties of the skin [Internet]. [consulté le 14 nov 2018]. Disponible sur : https://www.slideshare.net/ahmedaamer986/barrier-function-biomechanical-properties-of-the-skin

198. Shelbourne Dental Clinic. Dental Bridge to replace missing teeth [Internet]. 2018 [consulté le 8 fév 2019]. Disponible sur : http://shelbourneclinic.ie/services/bridges/

199. Soroushian S, Duailibi M, Duailibi S, Zhang W, Litterman R, Pruit I, et coll. Characterization of enamel and dentin protein expression in bioengineered human tooth tissues [Poster]. Boston: Tufts University School of dental medicine; 2010 [consulté le 28 nov 2018]. Disponible sur : https://www.technologynetworks.com/cell-science/posters/characterization-of-enamel-and-dentin-protein-expression-in-bioengineered-human-tooth-tissues-230191

200. Vitz E. Secondary Protein Structure in Silk. Chemistry LibreTexts [Internet]. 2016 [consulté le 14 nov 2018]. Disponible sur : https://chem.libretexts.org/Exemplars_and_Case_Studies/Exemplars/Culture/Secondary_Protein_Structure_in_Silk

MARCUS Laure – La régénération d'un organe dentaire entier et fonctionnel par bio-ingénierie

Nancy 2019 : 170 Pages ; 65 figures ; 5 tableaux

Th. : Chir.- Dent. : Nancy 2019

Mots clés :
- Bio-ingénierie
- Régénération
- Dent fonctionnelle
- Cellule souche

Résumé :

Actuellement, il existe plusieurs façons de remplacer une dent manquante : la prothèse fixée, la prothèse amovible, l'implant ou l'auto-transplantation. Aucune de ces techniques n'offre une réhabilitation parfaite même si certaines tentent de s'en approcher.

Les récentes avancées dans la recherche en médecine régénérative ont révélé une nouvelle perspective de remplacement de l'organe dentaire à travers l'exploitation des cellules souches et l'utilisation des techniques d'ingénierie tissulaire. La régénération d'un organe entier et fonctionnel devient possible grâce à l'étude du développement dentaire embryologique et à sa reproduction.

Les chercheurs ont abouti à deux techniques distinctes qui ont chacune donné des résultats encourageant sur l'animal. La première s'appuie sur l'utilisation d'une « matrice », résorbable ou non, de la forme d'une dent, implanté *in vivo* et guidant la différentiation des cellules souches. La seconde se base sur une culture de cellules *in vitro* qui aboutit à la création d'un germe dentaire, implanté *a postériori* en bouche. Tout ceci dans le but de produire un organe dentaire s'approchant au maximum de la dent naturelle, réhabilitant l'aspect, les fonctions physiologiques (innervation et vascularisation) ainsi que la parfaite intégration dans son environnement.

Membres du Jury :

Pr. P. MARTRETTE	Professeur des Universités	Président
Dr. J. GUILLET-THIBAULT	Maître de Conférences des Universités	Co-Directrice
Dr. S. CLERC	Assistant	Co-Directeur
Dr. V. MOBY	Maître de Conférences des Universités	Juge

Adresse de l'Auteur :

Laure MARCUS

2, rue de vellire

57530 PANGE