



**HAL**  
open science

# Les cellules souches bucco-dentaires : prélèvement, culture et possibilités thérapeutiques

Florian Attias

► **To cite this version:**

Florian Attias. Les cellules souches bucco-dentaires : prélèvement, culture et possibilités thérapeutiques. Médecine humaine et pathologie. 2016. dumas-01469684

**HAL Id: dumas-01469684**

**<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-01469684>**

Submitted on 21 Feb 2017

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

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



Année universitaire 2016/2017

UNIVERSITÉ NICE-SOPHIA ANTIPOLIS  
FACULTÉ DE CHIRURGIE DENTAIRE  
24 Avenue des Diablos Bleus, 06357 Nice Cedex 04

# Les cellules souches bucco-dentaires : prélèvement, culture et possibilités thérapeutiques

Année 2016

Thèse n°42-57-16-29

## THÈSE

Présentée et publiquement soutenue devant  
la Faculté de Chirurgie Dentaire de Nice  
Le 27 Octobre 2016 Par

**Monsieur Florian ATTIAS**

Né le 11/12/1991 à Marseille (13)  
Pour obtenir le grade de :

**DOCTEUR EN CHIRURGIE DENTAIRE (Diplôme d'État)**

---

Examineurs :

Madame le Professeur  
Monsieur le Docteur  
Madame le Docteur  
Monsieur le Docteur  
Monsieur le Docteur

Marie-France BERTRAND  
Yves ALLARD  
Séverine VINCENT-BUGNAS  
Adrien PAUL  
Stéphane PERRIN

Président du jury  
Assesseur  
Assesseur  
Directeur de thèse  
Membre invité



UNIVERSITÉ NICE-SOPHIA ANTIPOLIS  
FACULTÉ DE CHIRURGIE DENTAIRE  
24 Avenue des Diablos Bleus, 06357 Nice Cedex 04

# Les cellules souches bucco-dentaires : prélèvement, culture et possibilités thérapeutiques

Année 2016

Thèse n°42-57-16-29

## THÈSE

Présentée et publiquement soutenue devant  
la Faculté de Chirurgie Dentaire de Nice  
Le 27 Octobre 2016 Par

**Monsieur Florian ATTIAS**

Né le 11/12/1991 à Marseille (13)  
Pour obtenir le grade de :

**DOCTEUR EN CHIRURGIE DENTAIRE (Diplôme d'État)**

---

Examineurs :

Madame le Professeur  
Monsieur le Docteur  
Madame le Docteur  
Monsieur le Docteur  
Monsieur le Docteur

Marie-France BERTRAND  
Yves ALLARD  
Séverine VINCENT-BUGNAS  
Adrien PAUL  
Stéphane PERRIN

Président du jury  
Assesseur  
Assesseur  
Directeur de thèse  
Membre invité

## CORPS ENSEIGNANT

### 56<sup>ème</sup> section : DEVELOPPEMENT, CROISSANCE ET PREVENTION

#### **Sous-section 01 : ODONTOLOGIE PEDIATRIQUE**

Professeur des Universités : Mme MULLER-BOLLA Michèle  
Maître de Conférences des Universités : Mme JOSEPH Clara  
Assistant Hospitalier Universitaire : Mme PIERRE Audrey

#### **Sous-section 02 : ORTHOPEDIE DENTO-FACIALE**

Professeur des Universités : Mme MANIERE-EZVAN Armelle  
Assistante Associée-Praticien Associée : Mme OUEISS Arlette  
Assistant Hospitalier Universitaire : M. BUSSON Florian

#### **Sous-section 03 : PREVENTION, EPIDEMIOLOGIE, ECONOMIE DE LA SANTE, ODONTOLOGIE LEGALE**

Professeur des Universités : Mme LUPI-PEGURIER Laurence  
Assistant Hospitalier Universitaire : Mme SOSTHE Anne Laure  
Assistant Hospitalier Universitaire : Mme BORSA Leslie

### 57<sup>ème</sup> section : SCIENCES BIOLOGIQUES, MEDECINE ET CHIRURGIE BUCCALE

#### **Sous-section 01 : PARODONTOLOGIE**

Maître de Conférences des Universités : M. CHARBIT Yves  
Maître de Conférences des Universités : Mme VINCENT-BUGNAS Séverine  
Assistant Hospitalier Universitaire : M. RATHELOT Benjamin

#### **Sous-section 02 : CHIRURGIE BUCCALE, PATHOLOGIE ET THERAPEUTIQUE, ANESTHESIE ET REANIMATION**

Professeur des Universités Associées : Mme MERIGO Elisabetta  
Maître de Conférences des Universités : M. COCHAIS Patrice  
Maître de Conférences des Universités : M. SAVOLDELLI Charles  
Assistant Hospitalier Universitaire : M. PAUL Adrien

#### **Sous-section 03 : SCIENCES BIOLOGIQUES**

Professeur des Universités : Mme PRECHEUR-SABLAYROLLES Isabelle  
Maître de Conférences des Universités : Mme RAYBAUD Hélène  
Maître de Conférences des Universités : Mme VOHA Christine

### 58<sup>ème</sup> section : SCIENCES PHYSIQUES ET PHYSIOLOGIQUES ENDODONTIQUES ET PROTHETIQUES

#### **Sous-section 01 : ODONTOLOGIE CONSERVATRICE, ENDODONTIE**

Professeur des Universités : Mme BERTRAND Marie-France  
Professeur des Universités : M. MEDIONI Etienne  
Professeur Emérite : M. ROCCA Jean-Paul  
Maître de Conférences des Universités : Mme BRULAT-BOUCHARD Nathalie  
Maître de Conférences Associé des Universités : M. CEINOS Romain  
Assistant Hospitalier Universitaire : M. MORKOWSKI-GEMMI Thomas  
Assistant Hospitalier Universitaire : Mme DUVERNEUIL Laura  
Assistant Hospitalier Universitaire : M. GANDJIZADEH GHOUCHANI Mir-Payam

#### **Sous-section 02 : PROTHESES**

Professeur des Universités : Mme LASSAUZAY Claire  
Maître de Conférences des Universités : M. ALLARD Yves  
Maître de Conférences des Universités : M. LAPLANCHE Olivier  
Maître de Conférences des Universités : Mme POUYSSEGUR-ROUGIER Valérie  
Assistant Hospitalier Universitaire : Mme CERETTI Léonor  
Assistant Hospitalier Universitaire : M. OUDIN GENDREL Antoine  
Assistant Hospitalier Universitaire : M. SABOT Jean-Guy  
Assistant Hospitalier Universitaire : M. SAMMUT Arnaud

#### **Sous-section 03 : SCIENCES ANATOMIQUES ET PHYSIOLOGIQUES**

Professeur des Universités : M. BOLLA Marc  
Professeur des Universités : M. MAHLER Patrick  
Maître de Conférences des Universités : Mme EHRMANN Elodie  
Maître de Conférences des Universités : M. LEFORESTIER Eric

# **REMERCIEMENTS**

## **A Madame le Professeur Marie-France BERTRAND**

Docteur en Chirurgie Dentaire  
Docteur de l'Université de Nice Sophia-Antipolis  
Professeur des Universités - Praticien Hospitalier  
Vice Doyen de la Faculté d'Odontologie de Nice chargée de la Pédagogie  
Sous-section Odontologie Conservatrice Restauratrice et Endodontie

Je vous remercie grandement d'avoir accepté de présider ce jury de thèse. Je tiens à vous faire part de ma reconnaissance pour votre enseignement, votre patience, votre disponibilité et votre oreille attentive pour les étudiants. Veuillez croire en l'expression de mon profond respect et ma sincère gratitude.

## **A Monsieur le Docteur Yves ALLARD**

Docteur en Chirurgie Dentaire  
Docteur de l'Université de Nice Sophia-Antipolis  
Maître de Conférences des Universités - Praticien Hospitalier  
Sous-section Prothèses

Je suis très honoré de votre présence au sein de ce jury. J'ai beaucoup apprécié votre enseignement et votre expérience au cours de mon internat. J'admire votre passion pour votre métier et l'enseignement ainsi que vos compétences cliniques et théoriques. Je tenais à vous exprimer toute la sympathie et la considération que j'ai pour vous.

## **A Madame le Docteur Séverine VINCENT-BUGNAS**

Docteur en Chirurgie Dentaire  
Docteur de l'Université de Nice Sophia-Antipolis  
Maître de Conférences des Universités - Praticien Hospitalier  
Sous-section Parodontologie

Je vous suis très reconnaissant d'avoir accepté sans hésitation de siéger dans ce jury. Je tenais à vous remercier pour m'avoir suivi et formé à la parodontologie et à l'implantologie pendant mon internat. Votre rigueur et votre sympathie font de vous une enseignante remarquable. Veuillez trouver dans ce travail l'expression de la grande estime que j'ai pour vous.

**A Monsieur le Docteur Adrien PAUL**

Docteur en Chirurgie Dentaire  
Docteur de l'Université de Nice Sophia-Antipolis  
Assistant Hospitalier Universitaire - Praticien Hospitalier  
Sous-section Chirurgie Orale

Je vous remercie sincèrement d'avoir accepté de diriger ce travail. Vous avez été pour moi un directeur de thèse exemplaire. Merci pour votre disponibilité, votre grande patience et le savoir-faire clinique que vous m'avez transmis. Veuillez recueillir dans ce travail l'expression de toute mon amitié et ma gratitude.

**A Monsieur le Docteur Stéphane PERRIN**

Docteur en Chirurgie Dentaire  
Ancien Assistant Hospitalier Universitaire de la faculté d'Aix-Marseille  
Sous-section Chirurgie Orale

C'est un honneur de vous compter parmi les membres de ce jury de thèse. Je tenais à vous remercier d'avoir fait le déplacement et vous témoigner mon respect et mon admiration pour votre travail, votre calme et toutes vos connaissances. J'ai énormément appris en travaillant à vos côtés. Je vous adresse toute ma reconnaissance et toute mon amitié.

## Table des matières

<b><u>Introduction</u></b> .....	<b>8</b>
<b><u>I/ Les cellules souches</u></b> .....	<b>11</b>
1) Généralités.....	12
2) Les différents types de cellules souches.....	14
A) Classification des cellules souches selon leur degré de différenciation.....	14
• Les cellules souches totipotentes.....	14
• Les cellules souches pluripotentes.....	14
• Les cellules souches multipotentes.....	15
• Les cellules souches unipotentes.....	15
B) Classification des cellules souches selon leur origine.....	16
• Les cellules souches embryonnaires.....	16
• Les cellules souches fœtales.....	17
• Les cellules souches adultes.....	18
<b><u>II/ Prélèvement et culture des cellules souches bucco-dentaires</u></b> .....	<b>20</b>
1) Où trouver des cellules souches ? .....	21
A) Pulpe dentaire (DPSC) .....	22
B) Papille dentaire apicale (SCAP) .....	23
C) Follicule dentaire (DFSC) .....	24
D) Dents déciduales exfoliées (SHED) .....	25
E) Ligament parodontal (PDLSC) .....	26
F) Moelle osseuse (BMSC) .....	30
G) Muqueuse buccale (OESC/GMSC) .....	31
H) Périoste (PSC) .....	32
I) Tissu adipeux (ASC) .....	34
J) Germe dentaire (TGPC) .....	35
K) Glandes salivaires (SGSC) .....	36
2) Prélèvement des cellules souches.....	38
3) Isolation des cellules souches.....	40
4) Quantification et numération cellulaire.....	42
5) Mise en culture des cellules souches.....	50
6) Conservation des cellules souches.....	52
<b><u>III/ Les possibilités thérapeutiques</u></b> .....	<b>54</b>
1) Régénération.....	55
A) Régénération du tissu dentaire.....	55
B) Régénération osseuse.....	57
2) Activité immunomodulatrice des cellules souches.....	58
A) Au niveau général : l'exemple du diabète.....	59
B) Au niveau local : l'exemple de la parodontite.....	61
3) Discussion.....	65
<b><u>Conclusion</u></b> .....	<b>67</b>
<b><u>Références bibliographiques</u></b> .....	<b>69</b>



# **INTRODUCTION**

Le métier de chirurgien dentiste est en perpétuelle évolution et tend de plus en plus vers une philosophie conservatrice.

C'est pourquoi les cellules souches et leur potentiel de régénération intéressent grandement les chercheurs dans le domaine de l'odontologie mais également de la médecine et en font le grand défi médical du XXIème siècle.

C'est depuis la découverte en 1963 de cellules souches dans la moelle osseuse de la souris par Becker (1), qu'elles ont provoqué l'un des plus grands bouleversements de la biologie de ces dernières décennies.

Les cellules souches ont la particularité de pouvoir se différencier en n'importe quel tissu de l'organisme. Peu à peu, elles entrèrent dans des essais cliniques et furent l'objet de nombreuses recherches cliniques : elles ont été testées dans certaines expériences afin de réparer ou reconstruire des organes ou des tissus dégradés et ainsi soigner certaines pathologies (2).

L'année 2003 marqua une grande avancée dans le domaine de la thérapie cellulaire. En effet, une équipe du CHU de Lille greffa des cellules pancréatiques avec succès sur un patient diabétique de type I.

Une équipe du Texas a, quant à elle, greffé des cellules de moelle sur le cœur d'un malade. Cette greffe permit d'améliorer sa fonction cardiaque.

Plus tard, le Dr. Songtao Shi découvrit une nouvelle source de cellules souches adultes dans les dents de lait des enfants. Contrairement aux dents lactéales, si les dents permanentes sont endommagées ou perdues, elles ne se régénèrent pas. À l'heure actuelle, les dents ne peuvent être remplacées que par des prothèses classiques. Cependant, les progrès dans la biologie des cellules souches et du génie tissulaire peuvent présenter de nouvelles options pour le remplacement des dents perdues.

Egalement, de nombreuses maladies inflammatoires siégeant dans la cavité buccale pourraient trouver des thérapeutiques grâce à l'utilisation de ces cellules, d'autant que la cavité buccale dispose de nombreuses sources de cellules souches.

Cependant, de nombreux problèmes persistent actuellement dans le domaine de la thérapie cellulaire, c'est pourquoi son application à l'homme est encore limitée. Les problèmes immunitaires comme le risque de rejet constituent le problème majeur.

Egalement, il faut avoir conscience de l'absence de contrôle de la multiplication des

cellules greffées et du risque potentiel de développer un cancer.

Enfin le problème de l'éthique est soulevé, car le prélèvement de cellules souches embryonnaires entraîne la destruction de l'embryon. C'est pourquoi on s'intéresse également aux cellules souches adultes qui peuvent être prélevées sans danger pour le donneur. Cependant, leur utilisation s'en trouve très réglementée.

L'objectif de cette étude sera dans un premier temps de définir ce qu'est une cellule souche et d'en décrire les types connus à ce jour.

Puis nous étudierons tous les sites possibles où l'on peut prélever des cellules souches chez l'homme ainsi que les différentes techniques pour prélever, isoler et utiliser ces cellules souches.

Enfin nous exposerons les différentes possibilités thérapeutiques au niveau de la cavité buccale ainsi qu'au niveau systémique.

# **I/ LES CELLULES SOUCHES**

## 1) Généralités

Une cellule souche est une cellule indifférenciée.

Elle est capable de s'auto-renouveler, de se différencier en d'autres types cellulaires tout au long de la vie ; cependant, elle n'a pas la structure spécifique d'une cellule spécialisée. Les cellules souches ont aussi la capacité de proliférer en culture.

Les cellules souches peuvent être d'origine anténatales (embryon ou fœtus) ; péri-natales (cordon ombilical) ou post-natales (adultes avec ou sans transformation) elles peuvent être également obtenues par transfert de noyau.

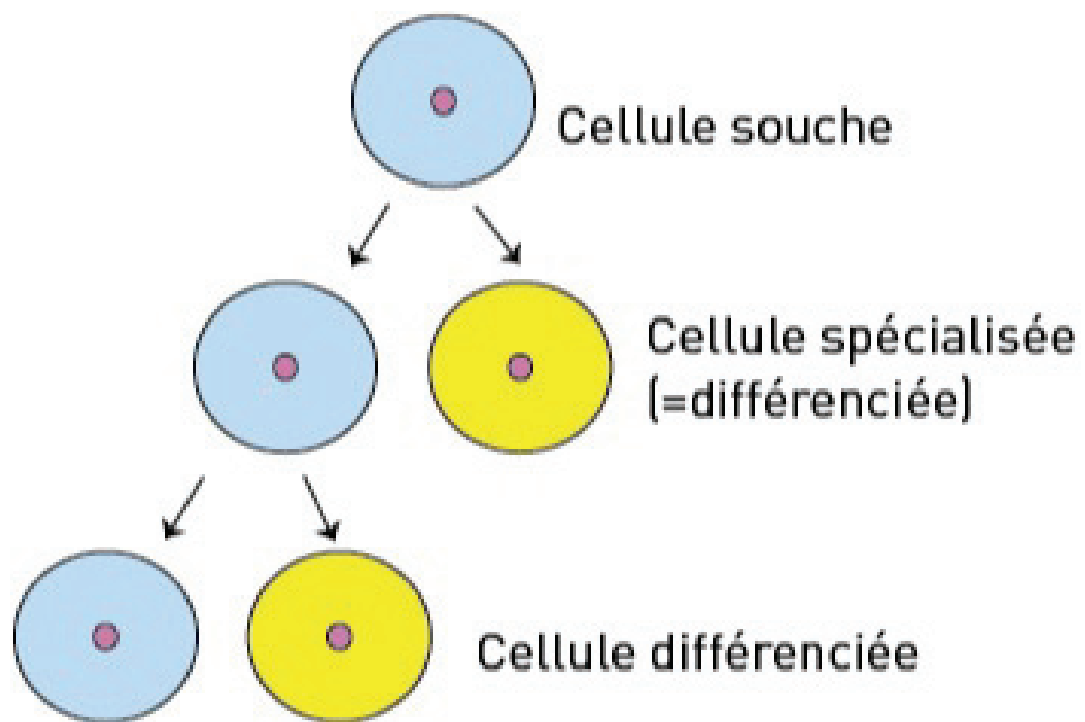
Grâce à ces propriétés de renouvellement et de différenciation, elles peuvent servir à régénérer ou recréer des tissus détruits (cicatrisation et renouvellement du pool cellulaire) : c'est la thérapie cellulaire (3).

Les cellules souches se classent en fonction de leur potentiel de différenciation plus ou moins important : totipotentes, pluripotentes, multipotentes ou unipotentes.

Une cellule souche peut donner deux cellules filles :

- Une cellule souche non spécialisée qui a la capacité de se renouveler sur de longues périodes par division cellulaire. Cela évite le tarissement du réservoir de cellules souches ; c'est donc une capacité à s'auto-renouveler qui est illimitée et quasi permanente.
  
- Une cellule capable de se différencier en un type spécifique sous certaines conditions physiologiques ou expérimentales (contact avec d'autres cellules, présence de facteurs de croissance...) : c'est une capacité de différenciation. Ce processus est irréversible.

On parle alors de division cellulaire asymétrique.



**Figure 1:** La division des cellules souches (2)

## **2) Les différents types de cellules souches**

### **A) Classification des cellules souches selon leur degré de différenciation**

Suivant leur potentiel de différenciation, on peut mettre en évidence quatre types de cellules souches : les cellules souches totipotentes, les cellules souches pluripotentes, les cellules souches multipotentes et les cellules souches unipotentes (Smith, 2006). (4)

- **Les cellules souches totipotentes**

Ce sont des blastomères (cellules provenant des premières divisions du zygote). Ce sont des cellules totipotentes car elles sont à l'origine de toutes les cellules de l'organisme (issues des trois feuillets embryonnaires : ectoderme, mésoderme et endoderme) et des annexes extra-embryonnaires (placenta, membranes). Une cellule souche totipotente peut donc donner à elle seule un organisme tout entier.

- **Les cellules souches pluripotentes**

Ce sont les cellules souches embryonnaires. Elles sont issues de la masse cellulaire interne du blastocyste et constituent le bouton embryonnaire. Les cellules souches pluripotentes peuvent générer toutes les lignées cellulaires constituant un individu sauf les annexes embryonnaires, contrairement aux cellules souches totipotentes. Elles ne peuvent donc pas conduire à la formation d'un organisme entier. (5)

- Les cellules souches multipotentes

Ce sont les cellules souches fœtales, du nouveau-né ou de l'adulte. Elles sont déjà engagées dans des voies de différenciation mais peuvent encore s'autorenouveler. En effet, les cellules souches multipotentes ne sont pas totalement immatures ; elles sont « déterminées » pour donner différents types de cellules différenciées et fonctionnelles. Leur pouvoir de différenciation est donc plus limité que celui des cellules souches embryonnaires. Par exemple, les cellules souches hématopoïétiques peuvent générer toutes les cellules de la lignée sanguine (globules rouges, polynucléaires, lymphocytes T ou B, macrophages) mais ne peuvent pas se différencier naturellement en cellules nerveuses.

- Les cellules souches unipotentes

Elles ne peuvent produire qu'un seul type cellulaire et possèdent toujours la capacité de s'autorenouveler. Par exemple : les cellules souches de la peau, de la muqueuse intestinale ou du foie. En effet, elles ont déjà acquis un certain degré de spécialisation durant leur division et sont fonctionnelles (ex : les préodontoblastes).



## **B) Classification des cellules souches selon leur origine**

Les cellules souches peuvent provenir de l'embryon, du fœtus ou encore de l'organisme adulte. De ce fait, toutes les cellules souches ne possèdent pas le même pouvoir de différenciation.

- Les cellules souches embryonnaires (ES)

Comme nous l'avons vu précédemment, les cellules souches embryonnaires sont des cellules souches pluripotentes. Elles ont la capacité de donner l'ensemble des cellules présentes chez l'adulte et de se renouveler (Biswas and Hutchins, 2007 ; Thomson et al., 1998). Rapidement après leur isolement (Martin, 1981), des études ont été développées visant à étudier la croissance et la différenciation de ces cellules. Elles ont été différenciées en cellules provenant des trois feuillets embryonnaires (mésoderme, ectoderme, et endoderme) et notamment en hépatocytes, cardiomyocytes, cellules endothéliales, neurones, cellules pancréatiques et progéniteurs hématopoïétiques (6). Les cellules souches embryonnaires ont donc un intérêt en médecine régénérative et notamment dans le traitement des pathologies hépatiques, sanguines, cardiaques, neuronales, et du diabète de type I.

Leur utilisation dans des protocoles d'ingénierie tissulaire expose à un risque de cancérisation et un rejet immun non négligeable lié au fort pouvoir mitogène des cellules souches (7, 8). La recherche sur les cellules souches pluripotentes est normalement interdite en France à l'exception de quelques cas.

L'équipe de Yamamoto (9) a mis en évidence, après la greffe de ces cellules dans le péritoine de souris, la formation de tératomes. Finalement, la greffe de cellules souches embryonnaires est une technique assez contraignante puisqu'elle requiert un traitement immunosuppresseur lourd.

- Les cellules souches fœtales

Les cellules souches fœtales sont des cellules souches multipotentes présentant un fort pouvoir de prolifération et qui peuvent être isolées à partir du sang fœtal, de la moelle osseuse ou d'autres tissus fœtaux comme les reins ou le foie (O'Donoghue and Fisk, 2004)(10). Parmi ces cellules, on distingue des cellules souches somatiques et des cellules souches germinales (6) dites EG (*Embryonic Germ cells*). Contrairement aux cellules embryonnaires, ces cellules sont déjà engagées vers un type cellulaire particulier.

Cependant, même si leur utilisation en médecine régénérative semble prometteuse, elle pose, au même titre que les cellules souches embryonnaires, certains problèmes éthiques.

Type de cellules souches fœtales	Origines tissulaires
Hématopoïétiques	Sang / Foie / Moelle osseuse
Mésenchymateuses	Sang / Foie / Moelle osseuse / Poumons / Reins / Pancréas
Endothéliales	Moelle osseuse / Placenta
Épithéliales	Foie / Pancréas
Neuronales	Cerveau / Moelle épinière

Tableau 1 : Les différents types de cellules souches fœtales et leurs origines tissulaires (10)

- Les cellules souches adultes

La meilleure façon de définir une cellule souche adulte est sa fonction : une cellule souche somatique (pour la distinguer des cellules germinales) assure le maintien physiologique d'un organe ou d'un tissu (l'homéostasie), elle remplace les cellules apoptosées, que ce soit naturellement ou après une lésion, et assure ainsi la pérennité et la fonction de l'organe pendant la vie de l'individu.

D'une part elles se multiplient à l'identique (ce qui évite le tarissement du réservoir de cellules souches) et d'autre part elles se différencient et acquièrent les caractéristiques du tissu à réparer (11).

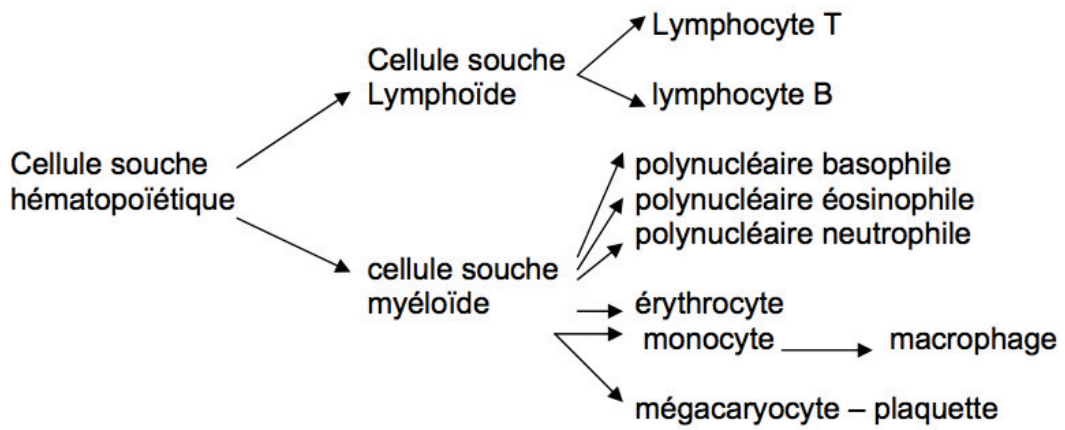


Figure 2: Différenciation et maturation des cellules hématopoïétiques de la moelle osseuse (11)

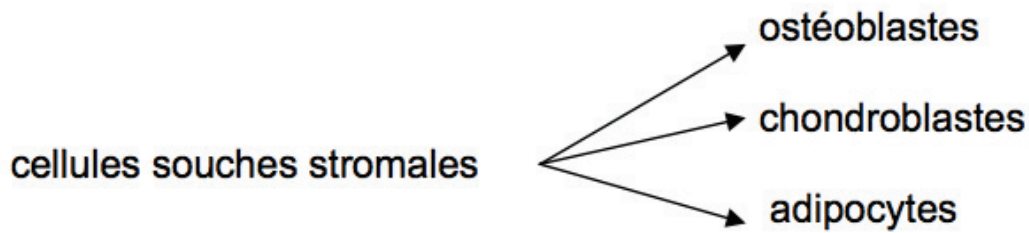


Figure 3: Différenciation et maturation des cellules stromales de la moelle osseuse (11)

**II/ PRELEVEMENT ET CULTURE**  
**DES CELLULES SOUCHES BUCCO-**  
**DENTAIRES**

## 1) Où trouver des cellules souches bucco-dentaires ?

Il existe de nombreuses sources de cellules souches bucco-dentaires :

- DPSC : Dental Pulp Stem Cell (cellules souches de la pulpe dentaire)
- SCAP : Stem Cell of Apical Papilla (cellules souches de la papille apicale)
- DFSC : Dental Follicle Stem Cell (cellules souches du follicule dentaire)
- SHED : Stem cells from Human Exfoliated Deciduous teeth (cellules souches des dents déciduales)
- PDLSC : PerioDontal Ligament Stem Cell (cellules souches du ligament parodontal)
- BMSC : Bone Marrow Stem Cell (cellules souches de la moelle osseuse)
- OESC : Oral Epithelium Stem Cell (cellules souches de l'épithélium oral)
- GMSC : Gingiva Mesenchymal Stem Cell (cellules souches du tissu conjonctif)
- PSC : Periosteum Stem Cell (cellules souches du périoste)
- ASC : Adipose-derived Stem Cells (cellules souches du tissu adipeux)
- TGPC : Tooth Germ Progenitor Cell (cellules souches du germe dentaire)
- SGSC : Salivary Glands Stem Cells (cellules souches des glandes salivaires)

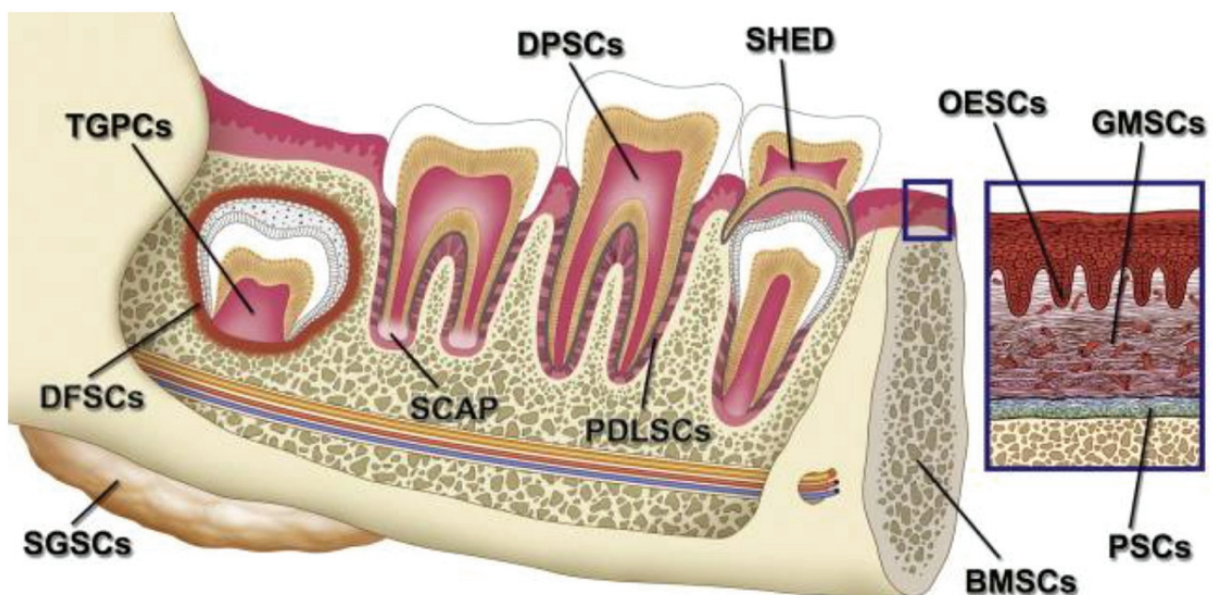


Figure 4 : localisation des cellules souches dans la région orale : (12)

## **A) Cellules souches de la pulpe dentaire (DPSC)**

C'est bien avant la découverte des cellules souches pulpaire par l'équipe de Gronthos en 2000 que l'on pensait que des cellules présentes dans la dent était capables de renouveler cette dernière. En effet, on savait que les odontoblastes matures et morts suite à une agression (chimique, mécanique, thermique ou bactérienne) étaient remplacées par de nouveaux odontoblastes différenciés à partir de fibroblastes.

Ces cellules appelées cellules souches de la pulpe dentaire (DPSC : Dental Pulp Stem Cell) présentaient des caractéristiques phénotypiques similaires à celles des cellules souches de la moelle osseuse et possèdent des propriétés propres aux cellules souches adultes : auto-renouvellement, multi différenciation et régénération du complexe pulpo-dentinaire. Ces cellules souches pulpaire représentent un stock important et accessible de cellules souches post-natales.

Physiologiquement, ces DPSC seraient dans un état dit « de repos » lorsqu'elles ne sont pas sollicitées, mais, dès qu'elles subissent une agression (une carie par exemple), elles sont activées et entraînent la cicatrisation pulpaire en formant des cellules spécialisées appelées « odontoblast-like » c'est à dire qui jouent le même rôle que les odontoblastes et permettront de remplacer ceux détruits pendant l'agression (13)

## **B) Cellules souches de la papille dentaire apicale (SCAP)**

Les cellules souches de la papille apicale (SCAP : Stem Cell of Apical Papilla) ont été trouvées dans le tissu papillaire dans la partie apicale des racines de dents en développement ; ce sont des cellules souches mésenchymateuses (MSCs).

Il a été constaté que les cellules de la papille apicale sont différentes de celles de la pulpe dentaire en termes de composants cellulaires et vasculaires moins nombreux que ceux de la pulpe. Cependant, les cellules de la papille apicale prolifèrent 2 à 3 fois mieux que celles de la pulpe in vitro.

D'autre part, les SCAP et DPSC sont aussi puissantes dans l'ostéo-différenciation dentinogénique que les MSCs de la moelle osseuse.

Les SCAP sont similaires aux DPSCs mais doivent être considérées comme une source distincte de cellules souches qui sont de puissants progéniteurs dentaires. Leur implication dans le développement des racines et le phénomène d'apexogenèse est encore discutée (14).

## **C) Cellules souches du follicule dentaire (DFSC)**

Le follicule dentaire est un tissu conjonctif lâche qui entoure la dent en cours de développement. Il a longtemps été considéré comme un tissu multipotent, sur la base de sa capacité à générer le ciment, l'os et le ligament parodontal.

Les cellules souches du follicule dentaire (DFSC : Dental Follicle Stem Cell) peuvent être isolées et cultivées dans des conditions de culture définies et sont depuis peu utilisées dans l'ingénierie tissulaire y compris dans la régénération parodontale et osseuse. Les DFSCs forment le ligament parodontal en différenciant des fibroblastes qui sécrètent du collagène et qui interagissent avec les fibres sur les surfaces des os et du ciment adjacent. Les DFSCs isolées à partir de la troisième molaire sont caractérisées par leur attachement rapide en culture, et leur capacité à former des nodules calcifiés compacts in vitro.

Les DFSCs, représentent comme les SCAPs des cellules d'un tissu en développement et pourraient donc présenter une plus grande plasticité que d'autres cellules souches dentaires. Cependant, de la même manière que pour les SCAPs, d'autres recherches doivent être effectuées sur les propriétés et les utilisations possibles de ces cellules. (15)

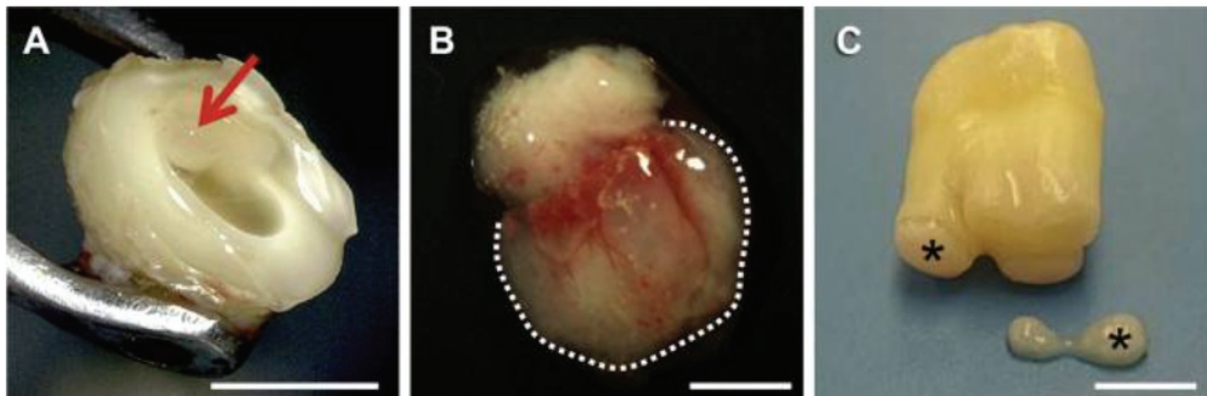


Figure 5 : Exemple de sources de cellules souches adultes dans le tissu dentaire. (A): Le tissu pulpaire exposé contient des DPSCs. (B) : Le sac folliculaire d'une 3ème molaire extraite chez une fille de 10 ans contient des DFSCs. (C) : La papille apicale d'une 3ème molaire extraite chez un garçon de 18 ans contient des SCAPs

#### **D) Cellules souches des dents déciduales exfoliées SHED**

Les cellules souches des dents de lait exfoliées appelées SHED pour Stem cells from Human Exfoliated Deciduous teeth possèdent les mêmes propriétés que celles de la pulpe dentaire (Cf. paragraphe précédent). De plus, elles possèdent des caractéristiques qui leur sont spécifiques : elles peuvent induire la formation d'une matrice osseuse avec une structure lamellaire en recrutant des cellules hôtes. Cette propriété distincte des SHEDs pour la formation de l'os peut être expliquée par la nature des dents de lait, dont la résorption des racines est accompagnée par la formation d'os.

Les SHEDs sont des cellules souches multipotentes, elles ont été identifiées comme une population de cellules clonogéniques hautement prolifératives capables de se différencier en une variété de types cellulaires, y compris les cellules neurales, les adipocytes, et les odontoblastes. Après la transplantation in vivo, les SHEDs ont montré être capables d'induire la formation d'os,



de générer de la dentine, et de survivre dans le cerveau de la souris. Cela montre qu'un organe humain naturellement exfolié contient une population de cellules souches. Ces cellules sont également capables de fournir suffisamment de cellules pour une application clinique potentielle. Ainsi, les dents exfoliées peuvent être une ressource unique inattendue pour les thérapies de cellules souches, y compris pour une greffe autologue de cellules souches (16).

## **E) Cellules souches du ligament parodontal (PDLSC)**

Le ligament parodontal (PDL) également appelé ligament alvéolo-dentaire (LAD) est un tissu conjonctif entourant la racine des dents (entre le ciment et l'os alvéolaire), très vascularisé et innervé, il a une épaisseur de 0,15 à 0,38mm. Sa largeur diminue avec l'âge et il possède un taux de renouvellement élevé.

Il joue trois grands rôles pour la dent : il est le support de cette dernière ; il absorbe les chocs lors de la mastication et est un récepteur sensoriel pour le positionnement de la mâchoire. Le PDL termine son édification au cours de l'éruption des dents (30).

Le ligament parodontal est une autre source de MSCs adultes dans les tissus dentaires et parodontaux. Ces cellules sont appelées PDLSC (PerioDontal Ligament Stem Cells). Ces dernières peuvent même être isolées à partir des dents extraites. Le ligament parodontal est principalement constitué de faisceaux de collagène, intégrant à la fois d'une part le ciment et d'autre part l'os alvéolaire. Les fibres sont disposées selon des orientations spécifiques pour maximiser l'absorption des forces masticatoires. Nous savons depuis longtemps que ce ligament contient une population de cellules progénitrices et plus récemment, des études ont identifié une population de cellules souches humaines capables de se différencier en une lignée de cellules mésenchymateuses et de produire des cellules appelées « cémentoblastes-like », des adipocytes et du tissu conjonctif riche en collagène de type I. Le potentiel de différenciation des PDLSCs est similaire à celui des BMSCs et des DPSCs (14). Les PDLSCs ont démontré leur capacité à régénérer les tissus parodontaux (ciment, ligament parodontal et l'os alvéolaire) dans des modèles animaux expérimentaux. Un rapport récent a suggéré que les caractéristiques des PDLSCs peuvent dépendre de deux facteurs :

- L'emplacement de sa récolte : les PDLSCs de la surface de l'os alvéolaire affichent une régénération supérieure de l'os alvéolaire par rapport aux PDLSCs de la surface de la racine (12,15).

- de l'âge du donneur : le potentiel de différenciation et la quantité des cellules sont meilleurs si le patient est jeune (44).

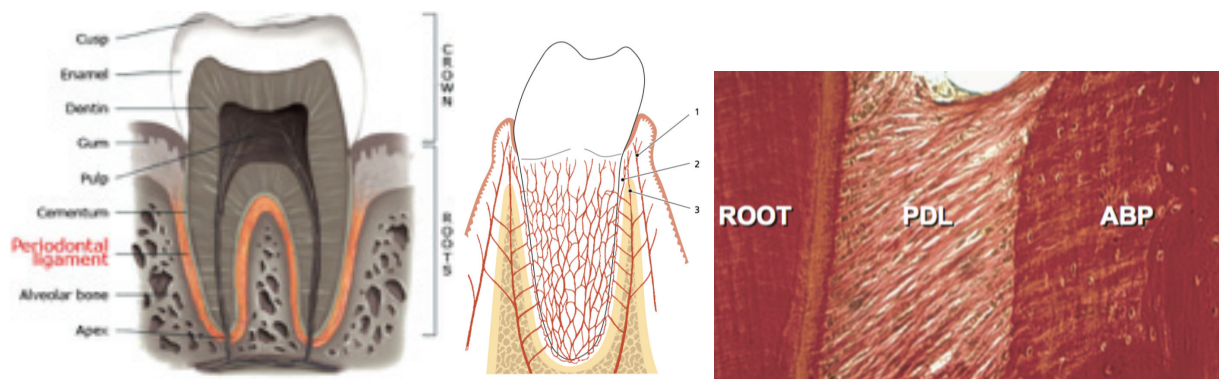


Figure 7 : Le ligament alvéolo-dentaire (schémas et vue microscopique) (52)

Appellation	DPSC	SCAP	SHED	PDLSC	DFSC
Localisation	Pulpe de la dent permanente	Papille apicale des dents immatures	Pulpe des dents déciduales exfoliées	Ligament parodontal	Follicule dentaire des dents en cours d'éruption
Taux de prolifération	modéré	élevé	élevé	élevé	élevé
Hétérogénéité	oui	oui	oui	oui	oui
Multi-potentialité	Odontoblastique, ostéoblastique, chondrocytaire, myocytaire, neurocytaire, adipocytaire, cellules épithéliales de la cornée, cellules mélanocytaires, iPS (cellules souches pluripotentes induites)	Odontoblastique, Ostéoblastique, neurocytaire, adipocytaire, iPS	Odontoblastique, ostéoblastique, neurocytaire, chondrocytaire, myocytaire, adipocytaire, iPS	Odontoblastique, ostéoblastique, neurocytaire, chondrocytaire, cémentoblastique	Odontoblastique, ostéoblastique, neurocytaire
Tissus réparés	Os, neurones, muscles, dentine pulpaire	Os, neurones, racines, dentine pulpaire	Os, neurones, muscles, dentine	Os, racines, parodonte	Os, parodonte

Tableau 2 : les différents types de cellules souches présentes dans l'organe dentaire (15)

## **F) Cellules souches de la moelle osseuse (BMSCs)**

La moelle osseuse adulte contient peu de cellules progénitrices multipotentes qui sont généralement appelées BMSCs. En dépit de leur faible nombre, ces cellules possèdent une forte capacité à se renouveler et à se différencier en divers types de cellules du tissu conjonctif : ce qui en fait une source de cellules souches appropriée pour la thérapie de régénération osseuse.

Les observations cliniques ont toujours indiqué que l'os greffé obtenu à partir de la zone cranio-faciale autologue greffé sur des sites cranio-faciaux fournit de meilleurs résultats et un volume osseux significativement plus élevé que l'os de la crête iliaque. Ces observations impliquent que les différents tissus donneurs squelettiques ont des propriétés régénératrices spécifiques au site qui peuvent dépendre du nombre de BMSCs présentes dans le greffon. Embryologiquement, les os du maxillaire et de la mandibule proviennent exclusivement de cellules de la crête neurale crânienne. Tandis que l'os de la crête iliaque est formé par le mésoderme. Ces différences d'origines embryologiques peuvent entraîner des différences fonctionnelles entre les BMSCs oro-faciales et celles de la crête iliaque chez l'homme. (17)

## **G) Cellules souches de la muqueuse buccale (OESCs/GMSCs)**

La muqueuse buccale est composée de l'épithélium pavimenteux stratifié et du tissu conjonctif sous-jacent constitué par la lamina propria, qui est une zone de tissu bien vascularisé. La partie sous-muqueuse peut contenir des glandes salivaires mineures, du tissu adipeux, des paquets vasculo-nerveux et des tissus lymphatiques en fonction du site.

A ce jour, deux types de cellules souches humaines adultes ont été identifiés dans la muqueuse buccale :

- l'une provient des cellules épithéliales orales progénitrices, qui sont une sous-population de petits kératinocytes oraux (inférieure à 40 µm). Bien que ces cellules semblent être des cellules souches équipotentiels (ne peuvent se développer que dans les cellules épithéliales), elles possèdent une clonogénicité et la capacité de régénérer une greffe (exemple : greffe épithélio-conjonctive).
- l'autre provient des cellules de la lamina propria, qui se fixent directement sur le périoste de l'os sous-jacent. En 2009, Zhang et al. caractérisent les premières MSCs gingivales humaines (GMSCs), qui présentaient une clonogénicité, un auto-renouvellement et une capacité de différenciation multipotentes similaire à celle des BMSCs. Les GMSCs prolifèrent plus rapidement que les BMSCs, présentent une morphologie stable et ne perdent pas leurs caractéristiques de MSCs.

La multipotence des GMSCs et OMSCs, leur facilité d'isolement, l'abondance clinique et l'expansion rapide *ex vivo* offrent un grand avantage en tant que source de cellules souches pour des applications cliniques potentielles. (12, 18, 19)

## **H) Cellules souches du périoste (PSC)**

Le périoste est un tissu conjonctif spécialisé qui recouvre la surface externe des os. La capacité ostéogénique du périoste des os longs a été démontrée en 1932. Plusieurs études ultérieures ont porté sur d'autres aspects de l'ostéogenèse du périoste y compris le développement des os longs, la relation entre le système vasculaire et le périoste et la capacité ostéogénique du périoste (20).

Histologiquement, le périoste se compose de deux couches distinctes (interne et externe). La zone externe contient principalement des fibroblastes et des fibres élastiques, et la zone interne contient des cellules souches mésenchymateuses, des cellules progénitrices ostéogéniques, des ostéoblastes et des fibroblastes, ainsi que des micro-vaisseaux et des nerfs sympathiques. Ces cellules sont capables de se différencier en ostéoblastes, en adipocytes, en chondrocytes et on retrouve l'expression des marqueurs typiques des MSCs.

Les cellules dérivées du périoste pourraient donc être utiles pour l'ingénierie tissulaire, en particulier pour la régénération osseuse. (21)

Des analyses comparatives chez le chien ont montré que le potentiel des cellules périostées *in vivo* pour former l'os étaient supérieure à celle des BMSCs.

Agata et al. (22) ont rapporté que les cellules humaines périostées proliféraient plus rapidement que les cellules stromales de la moelle osseuse et les transplantations sous-cutanées de cellules périostées traitées avec une combinaison de facteurs de croissance recombinants formaient plus de nouvel os que les BMSCs chez la souris.

Il a été montré que les greffes périostées induisent la formation d'os cortical, alors que la greffe de moelle osseuse induit la formation d'os spongieux. Tout ceci implique que la source des cellules transplantées peut influencer les propriétés structurelles de l'os régénéré.

Le fort potentiel ostéogénique des cellules du périoste a inspiré les dentistes pour l'utilisation du périoste dans les régénérations osseuses. En effet, la technique du lambeau de périoste inversé (23) a été recommandée pour l'augmentation osseuse alvéolaire, en liaison avec la pose de l'implant ou en association avec une intervention chirurgicale de greffe osseuse. En outre, les cellules périostées dérivées de cultures ont été utilisées pour des augmentations de crêtes alvéolaires ou des élévations du plancher sinusien.

Par conséquent, le périoste est une source de cellules souches utile pour la régénération osseuse, en particulier pour les gros défauts osseux.

### **I) Cellules souches du tissu adipeux (ASC)**

Le tissu adipeux est une source abondante de cellules souches mésenchymateuses qui a été largement étudié dans le domaine de la médecine régénérative comme source de cellules souches. Les MSCs du tissu adipeux peuvent être facilement récoltées via lipectomie ou liposuction du menton, du bras, de l'abdomen, des hanches, des fesses, des cuisses ou de la boule de Bichat en ce qui concerne la cavité orale ; le tout avec une faible morbidité.

Bien que les caractéristiques intrinsèques des ASCs semblent être différentes de celles des BMSCs, les ASCs présentent un fort potentiel ostéogénique et devraient donc être une source alternative de cellules souches mésenchymateuses pour la régénération osseuse en dentisterie. (24, 25)

Pieri et al. (26) ont démontré que la mise en place d'ASCs autologues avec un substitut osseux inorganique d'origine bovine (Bio-Oss) améliore la nouvelle formation osseuse et l'ostéointégration de l'implant.

La régénération du parodonte à l'aide des ASCs a également été expérimentée avec succès dans un modèle animal chez le rat. En outre, Ishizaka et al. (27) ont démontré que la transplantation des ASCs induit la régénération de la pulpe dans le canal radiculaire après pulpectomie chez les chiens.



## **J) Cellules souches du germe dentaire (TGPC)**

Les dents extraites à l'état de germe sont la plupart du temps les troisièmes molaires permanentes (dents de sagesse). Les cellules progénitrices issues de ces dents en formation sont appelées TGPC pour Tooth Germ Progenitor Cells. Ces TGPCs ont montré une activité de prolifération élevée et la capacité de se différencier in vitro dans des cellules des trois couches germinales, y compris les ostéoblastes, les cellules neurales, et les hépatocytes. Les TGPCs ont été analysées par transplantation dans un foie de rat endommagé par l'intermédiaire d'un tétrachlorure de carbone (CCl<sub>4</sub>) afin de déterminer si cette nouvelle source de cellules pourrait être utile pour la thérapie cellulaire. Les TGPCs ont empêché la progression de la fibrose hépatique dans le foie des rats et ont contribué à la restauration de la fonction hépatique. En outre, les fonctions du foie, observées par les niveaux de bilirubine sérique et de l'albumine, ont semblé être améliorées suite à une transplantation de TGPCs.

Ces résultats suggèrent que les TGPCs multipotentes sont des candidates à la thérapie cellulaire pour traiter les maladies du foie et offrir des possibilités sans précédent dans la réparation ou la régénération des tissus, y compris les tissus de la cavité buccale. (28)

## **K) Glandes salivaires (SGSC)**

Les patients souffrant d'une déficience de la fonction des glandes salivaires présentent une xérostomie et une qualité de vie compromise. Par conséquent, les cellules souches des glandes salivaires adultes sont censées être utiles pour une thérapie de transplantation autologue. Les glandes salivaires proviennent de l'endoderme et se composent de cellules acineuses et de cellules épithéliales canalaire avec une fonction exocrine. Après ligature du conduit des glandes salivaires, les cellules acineuses subissent une apoptose, et l'épithélium du conduit prolifère par la suite. Bien que l'existence de cellules souches des glandes salivaires a été suggérée par des études *in vivo*, une seule cellule souche qui donne naissance à tous les types de cellules épithéliales des glandes n'a pas encore été identifiée.

Kishi et al. (29) ont isolé des cellules souches des glandes salivaires sous-maxillaire de rat et ont constaté que les cellules ont un fort potentiel de prolifération et expriment des marqueurs de la lignée de cellules acineuses, canalaire et myoépithéliales.

Les différentes études réalisées sur les animaux suggèrent que la glande salivaire est une source de cellules souches prometteuse pour les futures thérapies chez les patients irradiés au niveau de la sphère ORL. Cependant, les cultures primaires de cellules dispersées contiennent toujours un certain nombre de cellules d'origines différentes, telles que des cellules parenchymateuses, des cellules stromales et des cellules des vaisseaux sanguins, ce qui rend difficile la sélection des cellules souches des glandes salivaires. Pour obtenir une véritable population de cellules souches pouvant être considérée comme une cellule souche de la glande salivaire, il est nécessaire de sélectionner les cellules portant un marqueur spécifique qui n'a pas encore été découvert. (12)

## **2) Prélèvement des cellules souches du ligament alvéolo-dentaire (LAD)**

Cette étude porte uniquement sur les cellules souches issues de ligaments alvéolo-dentaires que nous avons prélevés sur des dents entières extraites sur des patients du Pôle d'Odontologie de l'Hôpital Saint Roch au CHU de Nice dans le service d'Odontologie. Une attention particulière a été portée sur la syndesmotomie des dents extraites afin de réduire le risque de contamination des prélèvements par les cellules épithéliales. Après l'extraction, les dents ont été conservées dans 4ml de milieu de récupération préparé la veille et stocké à 4°C.

Ce milieu contient :

- du milieu complet (MC) : DMEM, sérum de veau foetal, L-Glutamine
- une solution antibiotique et antimycotique.

Le lendemain, les dents ont été transportées au laboratoire Micoralis de la Faculté d'Odontologie de Nice pour réaliser les différentes manipulations de laboratoire.

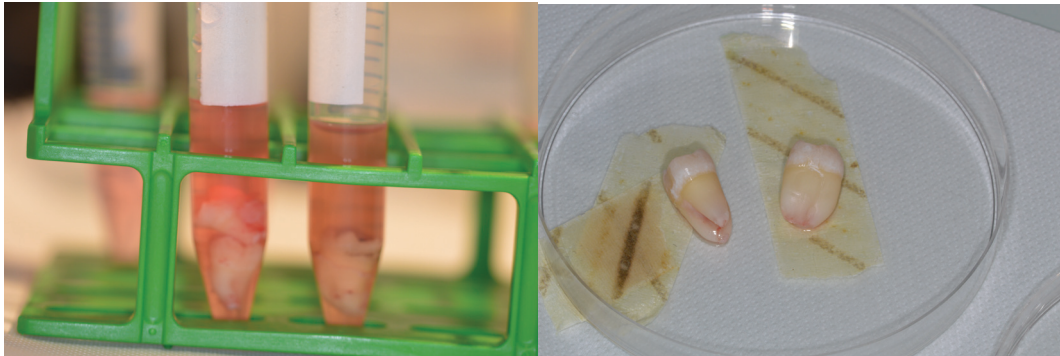


Figure 6 : Dents de sagesse extraites avant et après le prélèvement du LAD

Le LAD a ensuite été prélevé par dissection à l'aide d'une lame de bistouri n°11 afin de séparer le ligament de la dent, et en veillant toujours à ce qu'il n'y ait pas de contamination épithéliale provenant de la collerette sulculaire.

Le LAD de chaque dent a ensuite été placé dans un flacon distinct contenant également du milieu de culture complet.

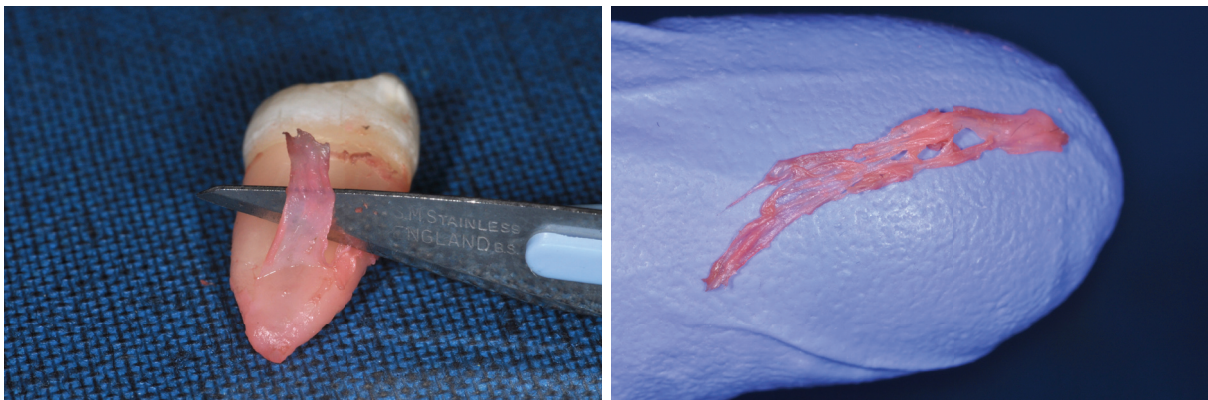


Figure 7 : Prélèvement du LAD par dissection

### **3) Dissociation et isolation des cellules souches**

#### Protocole de Dissociation : (31)

Une dissociation enzymatique systématique à l'aide de collagénase, de DNase et de dispase peut être associée ou non à une dissociation mécanique en fonction de la consistance des fragments.

Après le prélèvement des LADs, ils sont transférés dans du milieu complet enrichi avec les enzymes décrites plus haut. La dissociation enzymatique dure 45 minutes à 37°C sous agitation mécanique.

Si une dissociation mécanique est nécessaire, elle se fait à l'aide d'un robot type GentleMACS qui permet de créer une agitation intense à l'intérieur de tubes spécifiques munis de fines ailettes rotatives placées dans leur bouchon.

Après la dissociation, une centrifugation à 400g pendant 5min et la reprise du culot dans du milieu complet sans enzyme permettent de supprimer les enzymes et de stopper la dissociation.

Les broyats sont ensuite filtrés sur des filtres Smart Strainer de 70µm afin de supprimer les plus gros fragments et d'homogénéiser le prélèvement.

Les cellules issues de la filtration sont alors prêtes pour la suite des expérimentations :

- soit leur quantification et numération,
- soit leur culture et leur amplification.

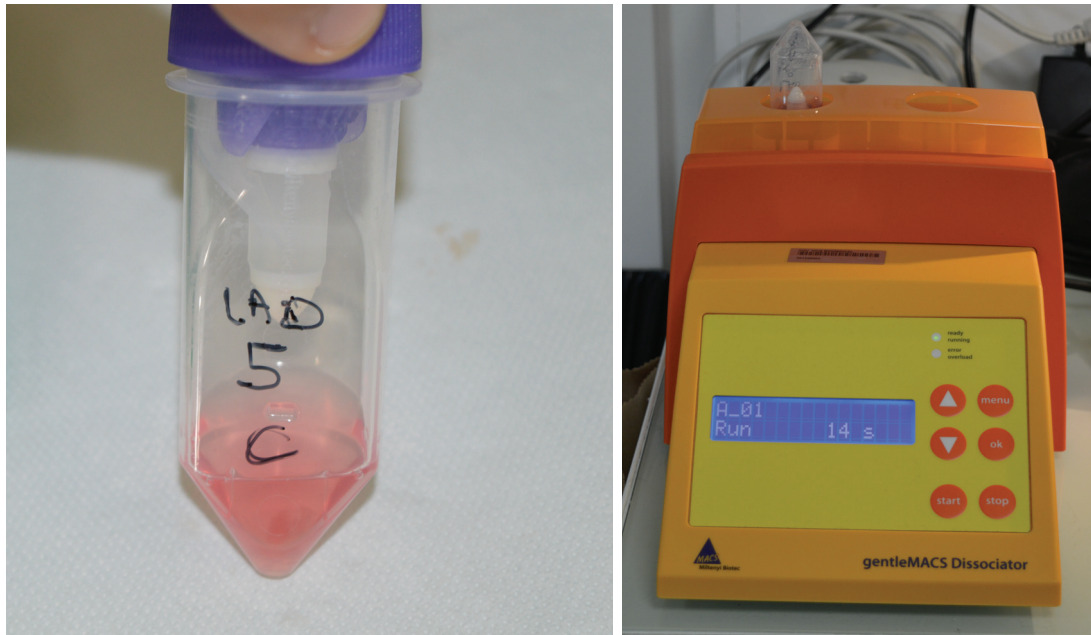


Figure 8 : Tubes GentleMACS munis d'ailettes rotatives dans leur bouchon et robot GentleMACS

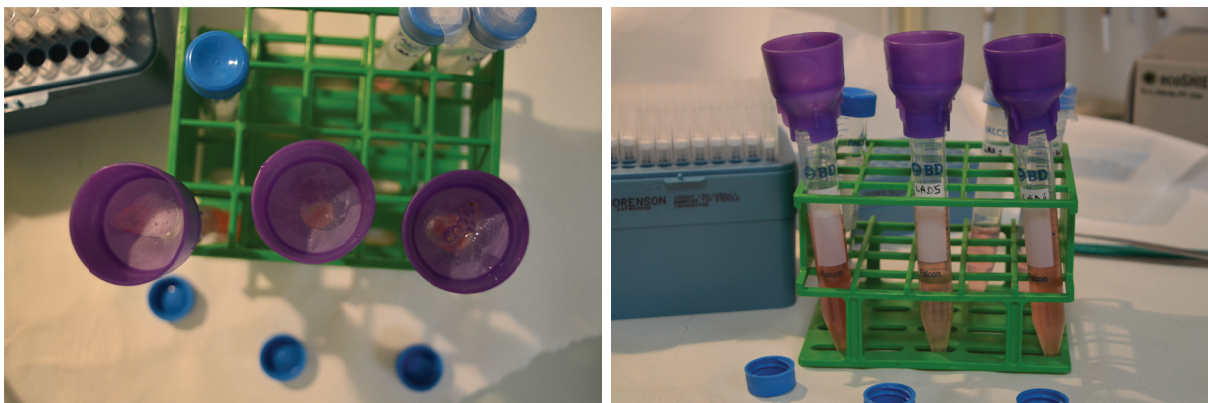


Figure 9 : Les filtres Smart Strainer de 70 $\mu$ m et leur contenu filtré

#### **4) Quantification et numération cellulaire**

Après avoir dissocié et isolé les cellules du ligament, il faut pouvoir en tirer des résultats. Pour ce faire nous avons réalisé trois étapes : l'observation des cellules, la numération des cellules et leur analyse grâce à la cytométrie de flux.

- **Observation**

Les cellules obtenues précédemment ont été placées dans 10 $\mu$ L de solution de resuspension à laquelle a été ajouté 10 $\mu$ L de Bleu Trypan. Le mélange a ensuite été placé entre lame et lamelle puis observé au microscope.

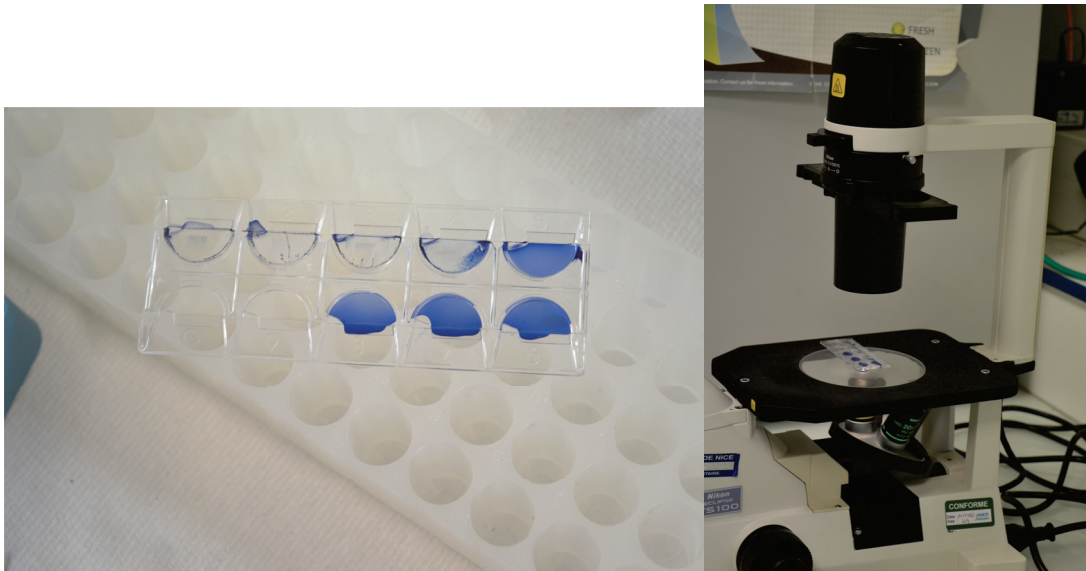


Figure 10 : Observation au microscope des cellules dissociées

Interprétation de l'observation au microscope : on constate qu'il y a une homogénéité des types cellulaires dans ce prélèvement, avec principalement des cellules de type fibroblastiques et qu'il ne semble pas y avoir de cellules épithéliales viables ou mortes.

- Numération des cellules à l'aide du Muse Cell Analyzer (Merck)

Le Muse est un instrument qui permet de quantifier le nombre de cellules présentes et de déterminer le nombre de cellules viables. Sa technologie utilise la détection par fluorescence et la cytométrie microcapillaire pour fournir une analyse. (32)

Résultats : Pour ce prélèvement par exemple, le Muse a compté 1,17 Millions de cellules par mL, avec 0,941 Million de cellules viables par mL soit 80,50% de viabilité sur une quantité de 0,584 Millions de cellules dans 450 $\mu$ L de solution finale.



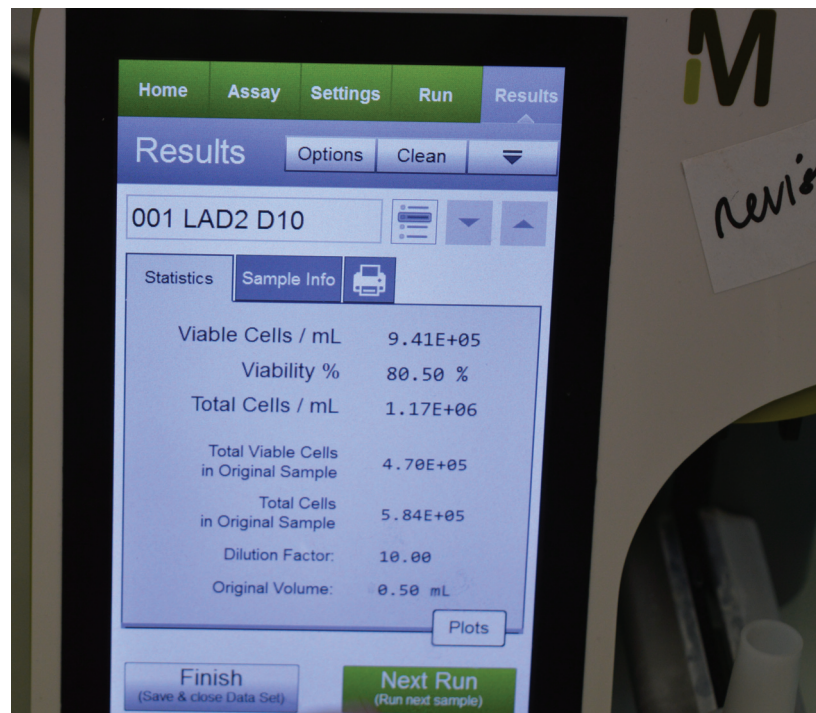


Figure 11 : Résultats sur l'écran du Muse après analyse

- Cytométrie de Flux

La cytométrie de flux permet l'étude précise de cellules isolées entraînées dans un flux liquide. Les cellules, alignées les unes derrière les autres, sont analysées une par une en défilant à grande vitesse devant une source lumineuse.

Cette technique permet une rapide caractérisation de chaque cellule individuellement de façon qualitative et multiparamétrique (morphologie des cellules et phénotypage) et quantitative (intérêt statistique).

Pour ce faire : les cellules sont propulsées à grande vitesse (30km/h) dans un flux hydrodynamique, elles passent devant une source lumineuse (laser) et on récupère la fluorescence issue d'un immunomarquage. La cyrométrie de flux est adaptée aux cellules en suspension (cellules tissulaires après dissociation) et aux liquides biologiques.

C'est une combinaison de 3 différents systèmes :

- Système fluide : Flux laminaire qui permet aux cellules en suspension de passer une à une devant le laser,
- Système optique : Rayon laser et différents filtres qui permettent de sélectionner les longueurs d'ondes appropriées,
- Système électronique : un photomultiplicateur qui capte la lumière émise, un digitaliseur qui transforme la lumière émise en signal électrique puis en signal numérique et un ordinateur qui gère et entrepose les données. (33, 34)

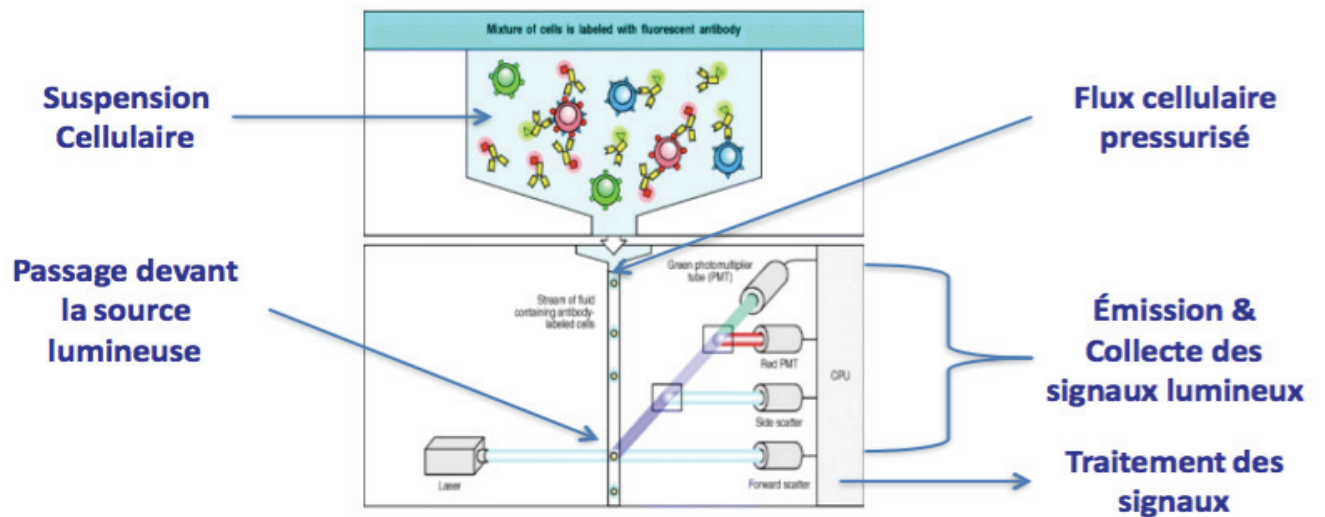


Figure 12 : Fonctionnement de la Cytométrie de Flux (33,34)

Il faut tout d'abord procéder au marquage de ces cellules par les anticorps préalablement sélectionnés. Ceux-ci sont spécifiques d'un type cellulaire (cellules hématopoïétiques, cellules souches mésenchymateuses, fibroblastes...) et peuvent aussi renseigner sur la vitalité des cellules (marqueur 7AAD).

ID	Patients	Tube	Cellules (M)	HTSFcX (µL)	Anticorps (µL)				
					CD326 BB515	CD70 PE	7AAD	CD45 PECy7	CD105 BV421
1	Patient A (LAD 2)	LAD A US	0,127	5	X	X	X	X	X
2		LAD A FMO MSC	0,127	5	5	X	10	5	X
3		LAD A Mix	0,127	5	5	20	10	5	5
4	Patient B (LAD 6)	LAD B US	0,597	5	X	X	X	X	X
5		LAD B FMO MSC	0,597	5	5	X	10	5	X
6		LAD B Mix	0,597	5	5	20	10	5	5

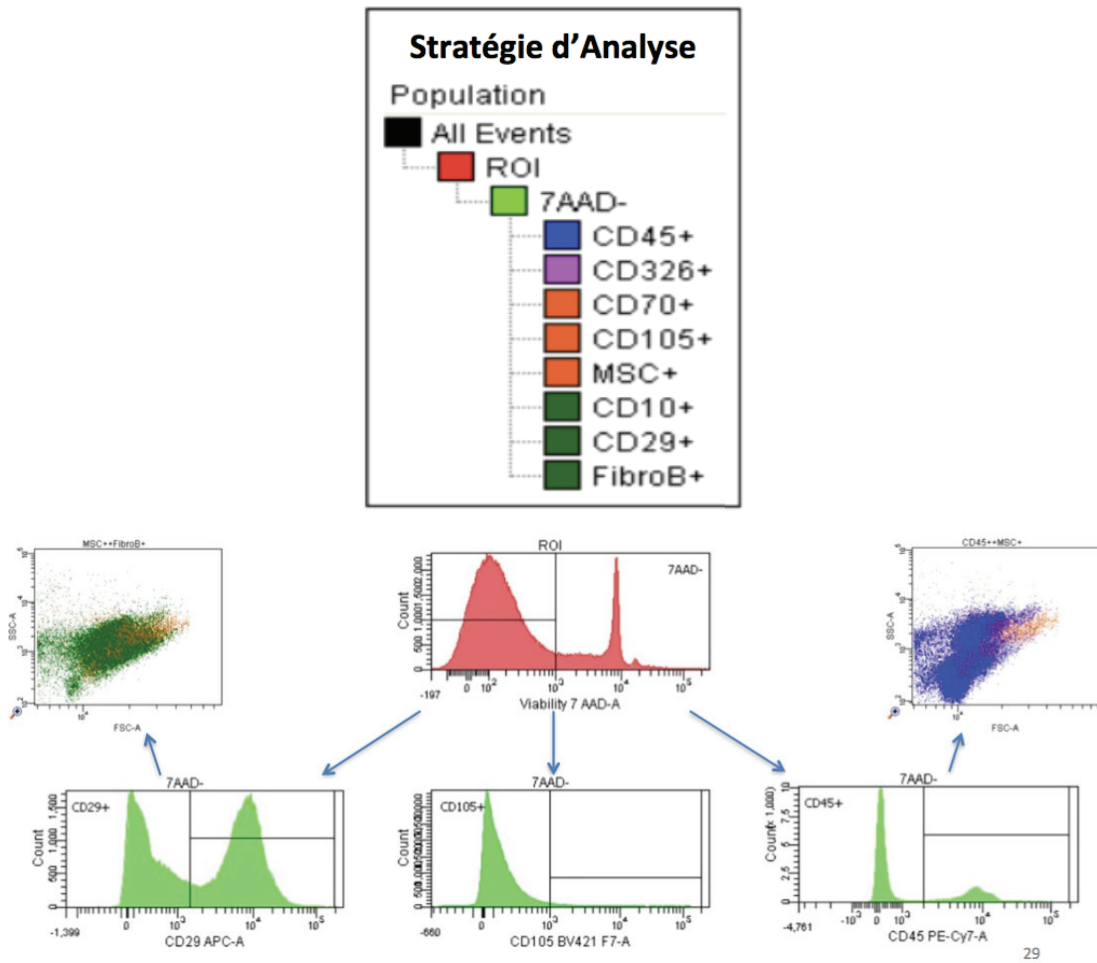
Tableau 3 : Choix des anticorps en fonction des tubes

Suite à ces marquages, il est alors possible de procéder à l'acquisition en cytométrie de flux au FACS Canto II.



Figure 13 : Cytomètre FACS Canto II

Lorsque l'acquisition et l'analyse des cellules sont terminées, le logiciel permet de paramétrer des stratégies d'analyse afin d'observer les types cellulaires sous forme de régions d'intérêt (ROI). On pourra ainsi sélectionner les cellules vitales ne présentant pas le marqueur de vitalité 7AAD (7AAD-), puis au sein de cette sélection, seulement les cellules mésenchymateuses souches présentant au moins un des marqueurs spécifiques CD70 et CD105, soit seulement les cellules hématopoïétiques présentant le marqueur CD45.



Bilan des Phéno MSCs & Fibroblastes		
	Phéno MSCs	Phéno Fibroblastes
<b>ROI</b>	± 30% de la Population Totale	
<b>7AAD-</b>	70%	68%
<b>CD45+</b>	27,8%	28,7%
<b>MSCs (CD70+ ou CD105+)</b>	0,7%	X
<b>Fibroblastes (CD10+ ou CD29+)</b>	X	67,7%
<b>CD326+</b>	0,4%	0,6%

Figure 14 : Exemple de résultat des analyses par cytométrie de flux

- Conclusions sur les analyses en cytométrie de flux :

Les analyses d'une douzaine de ligaments dentaires en cytométrie de flux ont permis de mettre en évidence la structure cellulaire de ces ligaments et plus particulièrement en cellules hématopoïétiques, cellules souches mésenchymateuses, fibroblastes et cellules épithéliales.

Les populations fibroblastiques et hématopoïétiques sont les plus représentées, mais la fraction de cellules souches mésenchymateuses n'est pas à négliger et représente 2% des cellules du ligament. Ce sont en particulier ces cellules qui nous intéressent et elles pourront être multipliées par des techniques d'expansion en culture cellulaire.

Bilan du Phénotype HMF des LADs				
		Types Cellulaires (% of 7AAD-)		
		CD45+	MSCs	Fibroblastes
LADs 171215	LAD 2	61,5	0	X
	LAD 5	25,7	0,5	X
	LAD 6	58,5	9	X
LADs 280116	Phéno MSCs	28,25	0,7	X
	Phéno FibroB		X	67,7
LADs 250216	LAD 1	30,7	2,7	34,1
	LAD 2	39	1,6	9,3
	LAD 3	27,6	1,7	56,6
	LAD 4	5,2	0,8	13,9
LADs 240316	LAD 1	52,4	1,7	26,5
	LAD 2	58,3	5,6	27,5
<b>Moyenne (%)</b>		<b>38,7</b>	<b>2,4</b>	<b>33,7</b>
<b>Écart-Type (%)</b>		<b>18,5</b>	<b>2,8</b>	<b>21,4</b>

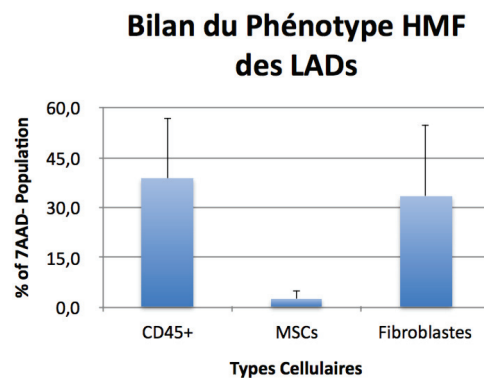


Figure 15 : Bilan du phénotype HMF des LADs

## 5) Mise en culture des cellules souches

La culture de cellules souches mésenchymateuses se fait en laboratoire, c'est une technique de culture *in vitro*, dans un milieu artificiel, c'est à dire, de composition connue et sans variation due au métabolisme. Ce sont des techniques relativement récentes qui sont liées au développement des biotechnologies. Elles ont pour but d'étudier des phénomènes physiologiques, des mécanismes biochimiques sans avoir recours à l'expérimentation *in vivo*.

Certaines cellules souches adultes se multiplient très efficacement en culture et conservent leurs propriétés intactes (ex : les cellules souches nerveuses, épidermiques, ou mésenchymateuses), contrairement à d'autres qui perdent leur potentiel en se divisant (cellules souches hématopoïétiques) ou encore d'autres qui prolifèrent très peu *in vitro* (cellules souches musculaires). Ce comportement *in vitro* n'est pas prédictif de leur potentiel prolifératif *in vivo* mais est essentiel pour leur manipulation dans un but thérapeutique.

Nous prendrons ici l'exemple des cellules du ligament parodontal mises en culture.

Des améliorations ont été apportées dans les méthodes et les conditions de culture de cellules et ont permis aux PDLSCs de se développer rapidement sans perdre leurs propriétés. Pour la culture primaire de PDLSCs, deux méthodes sont possibles : la mise en culture après dissociation enzymatique et la mise en culture directe des explants de ligament (35).

Cependant, les PDLSCs cultivées par dissociation enzymatique avaient des taux plus élevés de prolifération, une meilleure efficacité de formation de colonies, et une capacité de différenciation plus forte que les PDLSCs cultivées par excroissance. De plus, le taux de succès de la culture primaire était plus important avec utilisation de collagénase de type I et de dispase (96,7%), qu'avec l'utilisation de trypsine et d'EDTA (72,7%).

Le milieu de culture, affecte également les caractéristiques biologiques de PDLSCs. Deux milieux sont largement utilisés pour les cultures de MSCs et de PDLSCs : le DMEM : (Dulbecco Modified Eagle's Minimal Essential Medium) et le milieu  $\alpha$ -MEM : (Milieu Essentiel Minimal) contenant de la L-glutamine et du L-acide ascorbique-2-phosphate. Cependant, les PDLSCs cultivées dans du  $\alpha$ -MEM ont des taux plus élevés de prolifération et un potentiel ostéogénique plus fort que les PDLSCs cultivées avec le DMEM (36). Cela peut être dû à la présence de plusieurs acides aminés, des vitamines et des nucléotides présents dans  $\alpha$ -MEM et pas dans le DMEM. Ainsi, le milieu  $\alpha$ -MEM semble plus approprié pour la culture de PDLSCs que le

DMEM.

Les cellules sont habituellement cultivées à 20% d'oxygène lors de l'expansion *in vitro*. Néanmoins, l'hypoxie semble être le micro-environnement physiologique des cellules souches. L'expression des marqueurs de la pluripotence (Oct-4, Sox-2 et c-Myc) et le potentiel de différenciation des PDLSCs étaient significativement augmentés après une culture avec moins de 2% d'oxygène (37). Ainsi, l'hypoxie facilite le maintien de la multipotence des PDLSCs.

Il est donc essentiel de respecter certains critères pour obtenir des résultats optimaux lors de la mise en culture des cellules souches (38).



## **6) Conservation des cellules souches**

Les cellules souches adultes ont démontré un énorme potentiel thérapeutique. La possibilité de conserver des cellules souches est essentielle pour leur utilisation dans des applications cliniques et de recherche.

La conservation permet le développement de banques de cellules. Comme la collecte de cellules souches provenant de sources telles que le sang de cordon ombilical peut être difficile à prédire ou à contrôler, la capacité de préserver les cellules dans des banques de cellules permet une utilisation ultérieure dans les laboratoires de recherche ou pour l'application clinique. La capacité à conserver les cellules permet de réaliser des tests de sécurité avant utilisation, ainsi que le transport des cellules entre les sites de collecte.

Le protocole de cryoconservation pour un type cellulaire donné nécessite comprend :

- le traitement pré-gel
- l'introduction d'une solution de cryoconservation
- le protocole de congélation
- le stockage

Même si le protocole varie légèrement d'un type de cellules à l'autre, on utilise la plupart du temps le diméthylsulfoxyde (DMSO) pour la cryoconservation de cellules souches, avec une concentration en DMSO de 10%.

Il n'y a pas de méthode universelle pour conserver les cellules souches. Les méthodes existantes de conservation des cellules sont basées sur des principes scientifiques, qui doivent conduire au développement de nouveaux protocoles ou de la modification des protocoles existants. Chaque élément du protocole (introduction de la solution de conservation, congélation, le stockage, le réchauffement) a le potentiel d'endommager les cellules s'il n'est pas effectué correctement. Les personnes qui effectuent ces protocoles de conservation doivent être formées à l'importance de ces éléments et la manière dont ils doivent être correctement effectués (39).

### **III/ LES POSSIBILITES THERAPEUTIQUES**

## 1) Régénération

Le domaine d'utilisation des cellules souches d'origine bucco-dentaire est immense, nous verrons dans cette partie quelles sont les possibilités actuelles de régénération au niveau de la cavité buccale.

### A) Régénération du tissu dentaire

Les cellules souches dentaires adultes peuvent se différencier en de nombreux composants dentaires, tels que la dentine, le ligament parodontal, le cément et le tissu de la pulpe dentaire, mais pas l'émail car celui-ci est formé à partir d'adamantoblastes, qui proviennent de cellules souches épithéliales ; ce sont les seules cellules d'origine ectodermiques, qui jouent un rôle dans l'odontogenèse. Ces dernières sont perdues après l'éruption de la dent, ce qui ne laisse pas de cellules souches humaines adultes ectodermiques disponibles pour la thérapie cellulaire (40).

Il existe deux populations de cellules souches impliquées dans la formation de la dent : les cellules souches épithéliales et les cellules souches mésenchymateuses. Les cellules souches mésenchymateuses ont le potentiel de se différencier en tissus de lignées mésodermiques (os, cartilage, tissu adipeux, muscle squelettique et stroma de tissu conjonctif). Les cellules souches mésenchymateuses situées dans une niche périvasculaire dans la pulpe dentaire, le ligament parodontal (PDL), le follicule dentaire et la moelle osseuse peuvent être des sources potentielles pour des thérapies cellulaires dans la régénération de la dent. Ces cellules souches adultes, présentent un potentiel de différenciation pour les cytotypes odontoblastiques, adipogéniques et neuronaux.

Les cellules souches postnatales autogènes semblent être les cellules les plus prometteuses pour la régénération de tissus dentaires par rapport aux cellules embryonnaires et allogéniques ou xénogéniques. En effet, elles offrent des sources relativement plus faciles d'accès, réduisent la possibilité de rejet immunitaire, de transmission d'agents pathogènes et limitent les préoccupations légales ou éthiques (41).

Une étude réalisée par Sonoyama et son équipe en 2006 (42) a montré qu'il était possible de recréer une racine dentaire à partir de cellules souches isolées à partir de la papille apicale radiculaire des dents humaines (SCAP). L'étude a été réalisée sur des cochons nains, sur lesquels ils ont transplanté les SCAPs et les PDLSCs pour générer une racine et son parodonte, capables de supporter une couronne en céramique. Ce travail intègre une stratégie de régénération tissulaire grâce à la médiation cellulaire. Cette approche de l'ingénierie tissulaire hybridée a conduit à la récupération de la résistance de la dent et de son apparence.

## B) Régénération osseuse

La résorption osseuse représente un défi majeur et est un problème de santé mondial. La nécessité d'une régénération osseuse en chirurgie crânienne, orale et maxillo-faciale et orthopédique est l'un des problèmes cliniques centraux dans la médecine régénérative et de réadaptation de nos jours.

La formation osseuse pendant l'embryogenèse est déclenchée par des cellules souches mésenchymateuses (CSM), l'agrégation et la condensation, qui progresse ensuite vers l'ossification endochondrale à travers la formation de cartilage ou d'ossification membraneuse à travers la différenciation des ostéoblastes. Bien que les MSCs sont rares dans l'os adulte, les cellules ostéoprogénitrices engagées du périoste et les MSCs multipotentes indifférenciées de la moelle osseuse sont impliquées dans la formation de l'os, ce qui est important dans le progrès structurel de guérison de la fracture. La triade classique obligatoire de la cicatrisation osseuse est la suivante : cellules, matrice extracellulaire et facteurs ostéoinductifs (43).

Exemple des cellules souches mésenchymateuses gingivales : les MSCs adultes récemment identifiées dans les tissus conjonctifs gingivaux (cellules souches mésenchymateuses gingivales (GMSCs)) ont un potentiel ostéogénique et sont capables de régénérer de l'os dans les défauts mandibulaires. Les GMSCs suppriment également la réponse inflammatoire en inhibant la prolifération des lymphocytes et des cytokines inflammatoires et en favorisant le recrutement de cellules T régulatrices et des cytokines anti-inflammatoires. Ainsi, les GMSCs peuvent potentiellement promouvoir un environnement favorable pour la régénération osseuse et sont actuellement en cours d'étude sur le plan thérapeutique. (41)

## **2) Activité immunomodulatrice des cellules souches**

Les cellules souches mésenchymateuses adultes ont reçu une attention considérable au cours des deux dernières décennies pour leur utilisation potentielle dans l'ingénierie tissulaire, principalement en raison de leur potentiel à se différencier en plusieurs lignées cellulaires. Récemment, les propriétés immunomodulatrices des cellules souches mésenchymateuses ont suscité un intérêt nouveau, notamment pour des approches thérapeutiques dans les maladies auto-immunes. Les cellules souches mésenchymateuses peuvent inhiber la prolifération des lymphocytes T activés *in vitro* et *in vivo*, mais également stimuler la prolifération des lymphocytes T régulateurs. Les cellules souches mésenchymateuses sont également connues pour être faiblement immunogènes et exercer un effet immunosuppresseur sur de nombreuses cellules (45).

En outre, l'administration intraveineuse de cellules souches mésenchymateuses allogènes a montré une diminution significative des réactions immunitaires de l'hôte dans des modèles animaux. Des essais cliniques utilisant des cellules souches mésenchymateuses humaines ont également produit des résultats prometteurs chez des patients atteints de maladies auto-immunes.

Les cellules souches mésenchymateuses identifiées à partir de divers tissus dentaires, y compris les cellules souches du desmodonte possèdent également des propriétés immunomodulatrices et multipotentes. Par conséquent, les cellules souches mésenchymateuses dentaires peuvent représenter une source de cellules de remplacement, non seulement pour la régénération des tissus, mais aussi en tant que thérapies pour des maladies inflammatoires et auto-immunes (45).

## A) Au niveau général : l'exemple du diabète

Le diabète est un véritable problème de santé publique dans le monde entier et sa fréquence est en constante augmentation. La recherche sur cette maladie est devenue prioritaire pour le domaine de l'auto-immunité. Ici, le défi consiste à développer des moyens sûrs et efficaces offrant la prévention ou l'inversion du diabète de type 1. Cela représenterait un accomplissement remarquable, surtout quand on considère que les études sur la prévention du diabète en utilisant des immunosuppresseurs, des auto-antigènes, et des régimes alimentaires spécifiques (entre autres) ont jusqu'ici démontré des résultats largement décevants. En effet, même si les efforts impliquant des agents immunosuppresseurs ont, au fil du temps, prouvé leur efficacité, le taux élevé de morbidité associé à l'immunosuppression à vie demeurerait une limitation majeure. C'est pourquoi, de nombreuses équipes de recherche s'intéressent à l'effet des MSCs sur ce type de pathologies (46).

Tout d'abord, les propriétés immunologiques associées aux cellules souches mésenchymateuses semblent cibler les facteurs pathogènes pour le diabète de type 1 : un dysfonctionnement des cellules immunitaires (les lymphocytes B et T, les cellules NK et les cellules dendritiques), ainsi que la présence de cytokines inflammatoires, ce qui conduit à maintenir la tolérance aux cellules  $\beta$  du pancréas qui sécrètent l'insuline.

En outre, les MSCs possèdent des propriétés immunomodulatrices spécifiques et semblent capables de désactiver l'auto-immunité par immunomodulation.

On pourrait spéculer que les MSCs pourraient réguler le diabète grâce à un effet direct en présentant à différents niveaux des molécules co-stimulatrices négatives et sécrétant des cytokines comme des facteurs de croissance et des interleukines IL-10 qui contrôlent les lymphocytes T.

Il est également possible que les MSCs puissent corriger la dérégulation observée au niveau des lymphocytes B et des cellules NK.

Compte tenu des données montrant l'interaction des cellules souches mésenchymateuses avec des cellules dendritiques entraînant la formation de cellules dendritiques régulées, il a été également proposé que les MSCs pourraient réguler le diabète de type 1 en ayant un effet indirect

sur la fonction des cellules dendritiques afin de les réguler. Les MSCs exercent également des effets anti-inflammatoires (47).

En résumé, bien que les effets immunomodulateurs des MSCs les rendent particulièrement intéressantes pour le traitement de cette maladie, les futures études devraient évaluer l'effet des MSCs sur la prévention et le traitement du diabète de type 1 à travers leurs effets immunomodulateurs en examinant les bases du mécanisme de ce phénomène d'abord chez les souris puis dans les études humaines pilotes. Cependant, à ce jour, le rôle des cellules souches mésenchymateuses dans le diabète de type 1 reste totalement inexploré.

Enfin, les MSCs ont montré des résultats prometteurs dans le traitement d'autres maladies auto-immunes comme l'encéphalomyélite auto-immune expérimentale et la polyarthrite rhumatoïde.

## B) Au niveau local : l'exemple de la parodontite

La parodontite est une maladie inflammatoire chronique qui conduit à la destruction de l'os alvéolaire, et finalement à la perte de la dent. Chez les individus génétiquement prédisposés, les bactéries parodonto-pathogènes déclenchent une réponse immunitaire inflammatoire où les macrophages activés sécrètent des cytokines inflammatoires et des lymphocytes T auxiliaires qui produisent de l'interleukine-17 et l'activateur du récepteur du facteur nucléaire kappa B ligand (RANKL) ainsi que du  $TNF\alpha$ . L'inflammation et la production de RANKL, provoquent une activation excessive des ostéoclastes. Il en résulte une modification du rapport entre la formation osseuse et la résorption, ce qui conduit à la perte osseuse.

Les traitements conventionnels comprennent notamment la suppression du dépôt bactérien, les procédures chirurgicales de régénération des tissus et l'amélioration de l'hygiène buccale. Ils peuvent ne pas être suffisants pour prévenir, ralentir ou arrêter la parodontite car ils ne ciblent pas la réponse inflammatoire ni l'activation des ostéoclastes. De nouveaux traitements sont donc nécessaires si nous voulons guérir cette maladie. L'utilisation de cellules souches mésenchymateuses pour traiter les maladies inflammatoires telles que la parodontite est un domaine d'intérêt. Surtout que les MSCs peuvent être obtenues à partir de nombreuses sources

telles que la moelle osseuse, la peau ou les dents, et peuvent être développées *ex vivo* pour générer un nombre suffisant de cellules (48, 49, 50).

Comme nous l'avons vu plus haut, les effets thérapeutiques de MSCs allogéniques ou autologues peuvent être attribuées principalement à leurs effets immunomodulateurs. De plus, leur fonction immunorégulatrice peut être augmentée par modification génétique. Les cellules souches mésenchymateuses génétiquement modifiées offrent de multiples façons de cibler la maladie parodontale : en plus de l'effet immunomodulateur puissant, elles peuvent inhiber la perte osseuse ou favoriser sa régénération.

En outre, la modulation génétique peut augmenter le potentiel thérapeutique des cellules souches mésenchymateuses. Le traitement consiste à moduler la réponse immunitaire de l'hôte en utilisant des cellules souches mésenchymateuses, qui ont pour but de favoriser la régénération osseuse et d'inhiber la résorption osseuse due à l'inflammation. Ceci pourrait donner des résultats de traitement améliorés de manière significative surtout en combinaison avec des traitements conventionnels.

Ainsi, l'ingénierie des cellules souches mésenchymateuses provenant de sources telles que la pulpe dentaire et le ligament parodontal représentent un grand intérêt potentiel, mais restent encore inexploitées à l'heure actuelle.



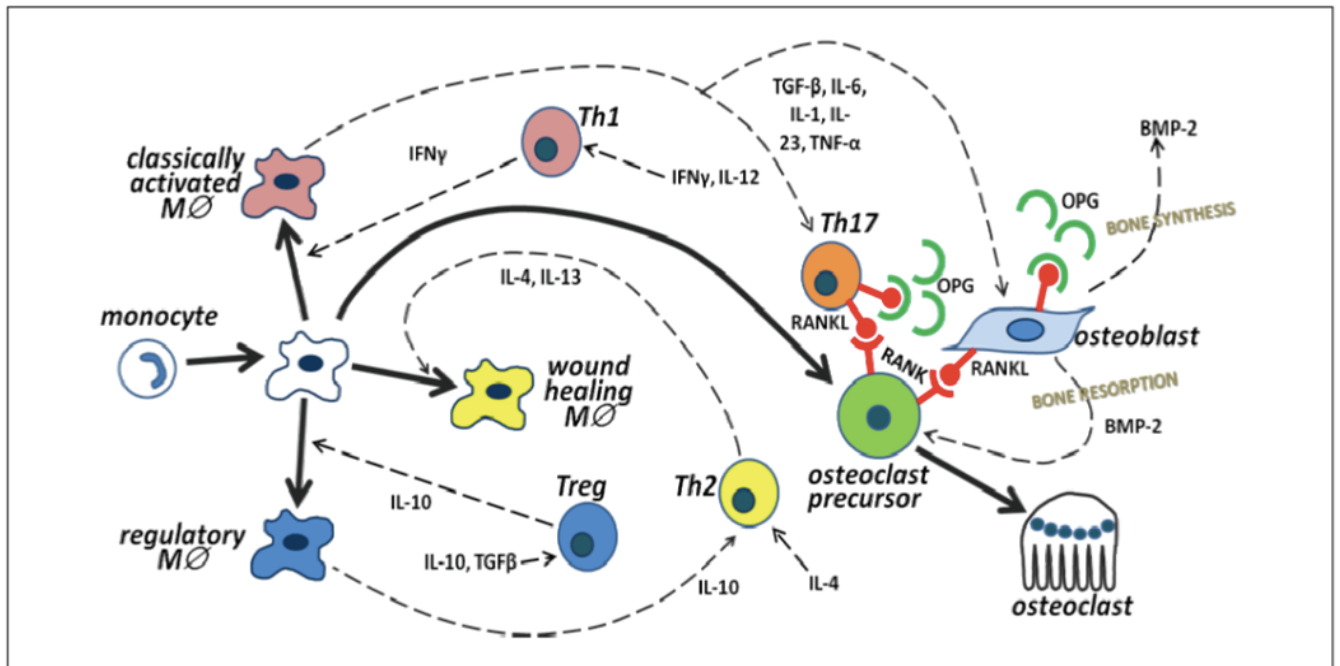


Figure 16 : La régulation immunitaire de la fonction des ostéoclastes dans l'inflammation parodontale (50).

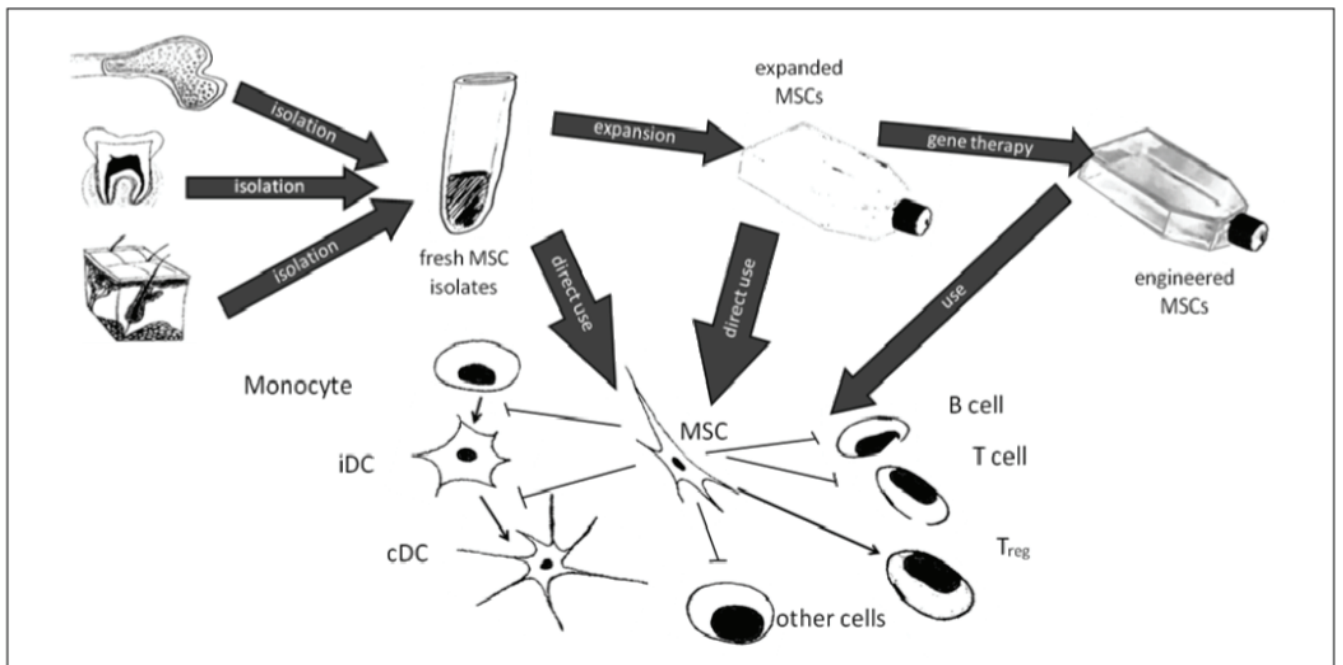


Figure 16 : Obtention et immunorégulation des cellules souches mésenchymateuses (50).

### **3) Discussion**

La disponibilité des cellules souches humaines, non seulement augmente l'espérance des thérapies de remplacement cellulaire, mais fournit également un système pour la compréhension des mécanismes du développement embryonnaire et la progression de la maladie. C'est pourquoi les recherches sur les cellules en sont au stade d'essais cliniques et sont au cœur de la recherche en ce début de XXIème siècles et offrent de belles perspectives d'avenir (51).

Cependant, au cours des nombreuses recherches effectuées sur les cellules souches, plusieurs problèmes ont été rencontrés :

Les problèmes immunitaires liés à toutes greffes restent importants en thérapie cellulaire. Il faut que le donneur et le receveur aient les génomes les plus semblables possibles pour augmenter les chances de réussite de la greffe. Il faut au minimum que le donneur et le receveur aient le même groupe tissulaire, il y a une chance sur quatre pour que deux frères aient le même groupe tissulaire. Dans 30 à 40% des greffes de cellules souches du sang entre deux frères, on observe le rejet ou la destruction des cellules greffées. En revanche, les cellules prélevées dans du sang du cordon ombilical sont rarement rejetées par l'organisme greffé. Seules les autogreffes permettent d'obtenir un rejet nul.

Pour pallier à ce problème il faut que le donneur prenne un traitement immunosuppresseur pour diminuer le risque de rejet. Avec tous les inconvénients que ce genre de traitement comporte (baisse de défenses immunitaires).

L'absence de contrôle de la multiplication des cellules greffées est un problème important : les cellules prolifèrent et le greffon a donc tendance à dégénérer en cancer.

La différenciation des cellules greffées est également un obstacle à la réussite totale de ce type de greffe. La différenciation dépend de facteurs biologiques. Les substances et les mécanismes de différenciation sont encore très mal connus à ce jour.

Aucune solution n'a encore été trouvée à ce jour pour résoudre les deux problèmes cités précédemment.

Le problème éthique est soulevé, car le prélèvement de cellules souches embryonnaires entraîne la destruction de l'embryon.

Différents pays ont choisi de réglementer l'utilisation de cellules souches embryonnaires de manières très différentes. Le sujet des cellules souches embryonnaires divise encore de nos jours l'opinion publique.

# **CONCLUSION**

Comme nous l'avons vu précédemment, les cellules souches sont au cœur de la recherche scientifique actuelle, il est nécessaire de bien définir les différents types de cellules et leurs localisations afin de pouvoir les prélever pour les utiliser ensuite.

Les manipulations que nous avons réalisées au laboratoire ont permis de montrer qu'il est possible de prélever, isoler et de mettre en culture des cellules souches bucco-dentaires et que ces prélèvements peuvent être faits par n'importe quel praticien sur un patient au cabinet.

Ceci montre l'immense potentiel thérapeutique de ces cellules dans notre métier et notre activité quotidienne.

Enfin nous avons vu que les cellules souches bucco-dentaires offrent de très nombreuses possibilités thérapeutiques pour la régénération ou la réparation des tissus, non seulement un niveau de la sphère bucco-dentaire, mais également au niveau général.

Les études sur les cellules sont donc très prometteuses et leur potentiel infini pour la dentisterie actuelle qui vise de plus en plus à régénérer et à conserver les tissus ; mais également pour la médecine générale.

Nous sommes à l'aube d'une « révolution cellulaire », et les cellules souches sont un espoir pour traiter certaines maladies encore incurables de nos jours.

**REFERENCES**  
**BIBLIOGRAPHIQUES**

1. Becker, A. J., McCulloch, E. A. & Till, J. E « Cytological demonstration of the clonal nature of spleen colonies derived from transplanted mouse marrow cells. » *Nature* 197, 452-453 (1963)
2. Surendran S, Sivamurthy G « Current Applications and Future Prospects of Stem Cells in Dentistry. » *Dent Update*. déc 2014;42(6):556-8, 560-1.
3. Huang L, Liang J, Geng Y, Tsang W-M, Yao X, Jhanji V, et al. Directing Adult Human Periodontal Ligament–Derived Stem Cells to Retinal Fate. » *Investig Ophthalmology Vis Sci*. 6 juin 2013;54(6):3965.
4. Smith A. « A glossary for stem-cell biology. » *Nature*. juin 2006;441(7097):1060-1060.
5. Alison MR, Poulsom R, Forbes S, Wright NA. « An introduction to stem cells. » *J Pathol*. juillet 2002;197(4):419-23.
6. Krebsbach PH, Robey PG. « Dental and skeletal stem cells: potential cellular therapeutics for craniofacial regeneration. » *J Dent Educ*. juin 2002;66(6):766-73.
7. McLaren A. « Stem cells: golden opportunities with ethical baggage. » *Science*. 9 juin 2000;288(5472):1778.
8. Wobus AM, Boheler KR. « Embryonic stem cells: prospects for developmental biology and cell therapy. » *Physiol Rev*. avr 2005;85(2):635-78.
9. Yamamoto M, Cui L, Johkura K, Asanuma K, Okouchi Y, Ogiwara N, et al. « Branching ducts similar to mesonephric ducts or ureteric buds in teratomas originating from mouse embryonic stem cells. » *Am J Physiol Renal Physiol*. janv 2006;290(1):F52-60.
10. O'Donoghue K, Fisk NM. « Fetal stem cells. » *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*. déc 2004;18(6):853-75.
11. Minguell JJ, Erices A, Conget P. « Mesenchymal stem cells. » *Exp Biol Med* Maywood NJ. juin 2001;226(6):507-20.

12. Hiroshi E, Wataru S, Masahiro N, Ikiru A, Kentaro A . « Stem cells in dentistry – Part I: Stem cell sources. » *Journal of Prosthodontic Research* 56 (2012) 151–165
13. Casagrande L, Cordeiro MM, Nör SA, Nör JE. « Dental pulp stem cells in regenerative dentistry. » *Odontology*.2011; 99(1):1-7.
14. Wataru Sonoyama, Yi Liu, Takayoshi Yamaza, Rocky S. Tuan, Songlin Wang, Songtao Shi, George T.-J. Huang. « Characterization of Apical Papilla and its Residing Stem Cells from Human Immature Permanent Teeth .» *A Pilot Study.J Endod.* 2008 Feb; 34(2): 166–171.
15. Estrela C, Alencar A, Kitten G,Vencio E, Gava E. « Mesenchymal Stem Cells in the Dental Tissues: Perspectives for Tissue Regeneration. » *Braz dental Journal* 2011) 22(2): 91-98
16. Miura M, Gronthos S, Zhao M, Lu B, Fisher LW, Robey PG, Shi S.  
« SHED: stem cells from human exfoliated deciduous teeth. » *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003 May 13;100(10):5807-12. Epub 2003 Apr 25.
17. A. Igarashi, K. Segoshi, Y. Sakai, H. Pan, M. Kanawa, Y. Higashi, et al. « Selection of common markers for bone marrow stromal cells from various bones using real-time RT-PCR: effects of passage number and donor age. » *Tissue Eng*, 13 (2007), pp. 2405–2417
18. Zhang Q, Shi S, Liu Y, Uyanne J, Shi Y, Shi S, et al. « Mesenchymal stem cells derived from human gingiva are capable of immunomodulatory functions and ameliorate inflammation-related tissue destruction in experimental colitis. » *J Immunol* 2009;183:7787–98.
19. Tomar GB, Srivastava RK, Gupta N, Barhanpurkar AP, Pote ST, Jhaveri HM, et al. « Human gingiva-derived mesenchymal stem cells are superior to bone marrow-derived mesenchymal stem cells for cell therapy in regenerative medicine. » *Biochem Biophys Res Commun* 2010;393: 377–83.
20. Fell HB. « The osteogenic capacity in vitro of periosteum and endosteum isolated from the limb skeleton of fowl embryos and young chicks. » *J Anat* 1932;66:157–80.



21. Wang Q, Huang C, Zeng F, Xue M, Zhang X. « Activation of the Hh pathway in periosteum-derived mesenchymal stem cells induces bone formation in vivo: implication for postnatal bone repair. » *Am J Pathol* 2010;177:3100–11.
22. Agata H, Asahina I, Yamazaki Y, Uchida M, Shinohara Y, Honda MJ, et al. « Effective bone engineering with periosteum-derived cells. » *J Dent Res* 2007;86:79–83.
23. Soltan M, Smiler D, Soltan C. « The inverted periosteal flap: a source of stem cells enhancing bone regeneration. » *Implant Dent* 2009;18:373–9.
24. Mizuno H, Tobita M, Uysal AC. « Concise review: adipose-derived stem cells as a novel tool for future regenerative medicine. » *Stem Cells* 2012;30:804–10.
25. Peng L, Jia Z, Yin X, Zhang X, Liu Y, Chen P, et al. « Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, cartilage, and adipose tissue. » *Stem Cells Dev* 2008;17:761–73.
26. Pieri F, Lucarelli E, Corinaldesi G, Aldini NN, Fini M, Parrilli A, et al. « Dose-dependent effect of adipose-derived adult stem cells on vertical bone regeneration in rabbit calvarium. » *Biomaterials* 2010;31:3527–35
27. Ishizaka R, Iohara K, Murakami M, Fukuta O, Nakashima M. « Regeneration of dental pulp following pulpectomy by fractionated stem/progenitor cells from bone marrow and adipose tissue. » *Biomaterials* 2012;33:2109–18.
28. Ikeda E1, Yagi K, Kojima M, Yagyuu T, Ohshima A, Sobajima S, Tadokoro M, Katsube Y, Isoda K, Kondoh M, Kawase M, Go MJ, Adachi H, Yokota Y, Kirita T, Ohgushi H. « Multipotent cells from the human third molar: feasibility of cell-based therapy for liver disease. » *Differentiation*. 2008 May;76(5):495-505. Epub 2007 Dec 17.
29. Kishi T, Takao T, Fujita K, Taniguchi H. « Clonal proliferation of multi-potent stem/progenitor cells in the neonatal and adult salivary glands. » *Biochem Biophys Res Commun* 2006;340:544–52.

30. Wenjun Zhu and Min Liang. « Periodontal Ligament Stem Cells: Current Status, Concerns, and Future Prospects. » Hindawi Publishing Corporation Stem Cells International Volume 2015, Article ID 972313, 11 pages.
31. Gay IC, Chen S, MacDougall M. « Isolation and characterization of multipotent human periodontal ligament stem cells. » *Orthod Craniofac Res.* 2007 Aug;10(3):149-60.
32. Khan A, Gillis K, Clor J, Tyagarajan K. « Simplified evaluation of apoptosis using the Muse cell analyzer. » *Postepy Biochem.* 2012;58(4):492-6.
33. Chattopadhyay PK, Roederer M. « Cytometry: today's technology and tomorrow's horizons. » *Methods* (2012) 57(3):251–8. doi: 10.1016/j.ymeth.2012.02.009
34. Tanner SD, Baranov VI, Ornatsky OI, Bandura DR, George TC. « An introduction to mass cytometry: fundamentals and applications. » *Cancer Immunol Immunother* (2013) 62(5):955–65. doi:10.1007/s00262-013-1416-8
35. H. L. B. Tran, V. N. Doan, H. T. N. Le, and L. T. Q. Ngo, « Various methods for isolation of multipotent human periodontal ligament cells for regenerative medicine, » *In Vitro Cellular & Developmental Biology—Animal*, vol. 50, no. 7, pp. 597–602, 2014.
36. I.-H. Jung, B.-S. Kwon, S.-H. Kim, H.-E. Shim, C.-M. Jun, and J.-H. Yun, « Optimal medium formulation for the long-term expansion and maintenance of human periodontal ligament stem cells. » *Journal of Periodontology*, vol. 84, no. 10, pp. 1434–1444, 2013.
37. Y. Zhou, W. Fan, and Y. Xiao, « The effect of hypoxia on the stemness and differentiation capacity of PDLC and DPC. » *BioMed Research International*, vol. 2014, Article ID 890675, 7 pages, 2014.
38. Wenjun Zhu and Min Liang, « Periodontal Ligament Stem Cells: Current Status, Concerns, and Future Prospects » *Stem Cells International Volume 2015* (2015), Article ID 972313, 11 pages

39. Jacob Hanna and Ubel Allison « Preservation of stem cells » *Organogenesis*. 2009 Jul-Sep; 5(3): 134–137.
40. Ulmer FL, Winkel A, Kohorst P, Stiesch M. « Stem cells--prospects in dentistry. » *Schweiz Monatsschr Zahnmed*. 2010;120(10):860-83.
41. Ramta Bansal and Aditya Jain « Current overview on dental stem cells applications in regenerative dentistry » *J Nat Sci Biol Med*. 2015 Jan-Jun; 6(1): 29–34.
42. Sonoyama W, Liu Y, Fang D, Yamaza T, Seo BM, Zhang C et al. « Mesenchymal stem cell-mediated functional tooth regeneration in Swine. » *PLoS*.2006;1:e79.
43. Arvidson K, Abdallah BM, Applegate LA, Baldini N, Cenni E, Gomez-Barrena E, Granchi D, Kassem M, Konttinen YT, Mustafa K, Pioletti DP, Sillat T, Finne-Wistrand A. « Bone regeneration and stem cells. » *J Cell Mol Med*. 2011 Apr;15(4):718-46. doi: 10.1111/j.1582-4934.2010.01224.x.
44. Jing Zhang, Ying An, Li-Na Gao, Yong-Jie Zhang, Yan Jin, Fa-Ming Chen « The effect of aging on the pluripotential capacity and regenerative potential of human periodontal ligament stem cells. » *Biomaterials* 33 (2012) 6974e6986
45. Wada N, Gronthos S, Bartold PM « Immunomodulatory effects of stem cells. » *Periodontol* 2000. 2013 Oct;63(1):198-216. doi: 10.1111/prd.12024.
46. Schatz D, Gale EA, Atkinson MA « Why can't we prevent type 1 diabetes? Maybe it's time to try a different combination. » *Diabetes Care* 26: 3326–3328, 2003
47. Reza A, Fiorina CN, Adra M, Mohamed HS « Immunomodulation by Mesenchymal Stem Cells A Potential Therapeutic Strategy for Type 1 Diabetes . » *Diabetes*. 2008 Jul; 57(7): 1759–1767.doi: 10.2337/db08-0180

48. Javazon EH, Beggs KJ, Flake AW « Mesenchymal stem cells: paradoxes of passaging. » *Exp Hematol* 2004; 32: 414-425.
49. Kuehnle I, Goodell MA. « The therapeutic potential of stem cells from adults. » *BMJ* 2002; 325: 372-376
50. Racz GZ, Kadar K, Foldes A, Kallo K, Perczel-Kovach K, Keremi B, Nagy A, Varga G « Immunomodulatory and potential therapeutic role of mesenchymal stem cells in periodontitis. » *J Physiol Pharmacol.* 2014 Jun;65(3):327-39.
51. Choumerianou DM, Dimitriou H, Kalmanti M « Stem cells: promises versus limitations. » *Tissue Eng Part B Rev.* 2008 Mar;14(1):53-60. doi: 10.1089/teb.2007.0216
52. Jan Lindhe, Thorkild Karring, Niklaus P. Lang « Clinical Periodontology and Implant Dentistry » WILEY Blackwell 1997

## *Serment d'Hippocrate*

*En présence des Maîtres de cette Faculté, de mes chers condisciples, devant l'effigie d'Hippocrate,*

*Je promets et je jure, au nom de l'Être Suprême, d'être fidèle aux lois de l'Honneur et de la probité dans l'exercice de La Médecine Dentaire.*

*Je donnerai mes soins gratuits à l'indigent et n'exigerai jamais un salaire au-dessus de mon travail, je ne participerai à aucun partage clandestin d'honoraires.*

*Admis dans l'intérieur des maisons, mes yeux ne verront pas ce qui se passe, ma langue taira les secrets qui me seront confiés et mon état ne servira pas à corrompre les mœurs ni à favoriser le crime.*

*Je ne permettrai pas que des considérations de religion, de nation, de race, de parti ou de classe sociale viennent s'interposer entre mon Devoir et mon patient.*

*Je garderai le respect absolu de la vie humaine dès sa conception.*

*Même sous la menace, je n'admettrai pas de faire usage de mes connaissances médicales contre les lois de l'Humanité.*

*Respectueux et reconnaissant envers les Maîtres, je rendrai à leurs enfants l'instruction que j'ai reçue de leurs pères.*

*Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses,*

*Que je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères si j'y manque.*

# Approbation – Improbation

Les opinions émises par les dissertations présentées, doivent être considérées comme propres à leurs auteurs, sans aucune approbation ou improbation de la Faculté de Chirurgie dentaire (1).

Lu et approuvé,

Vu,  
Nice, le

Le Président du jury,

Le Doyen de la Faculté de  
Chirurgie Dentaire de l'UNS

Professeur

Professeur Armelle MANIERE

(1) Les exemplaires destinés à la bibliothèque doivent être obligatoirement signés par le Doyen et par le Président du Jury.

# LES CELLULES SOUCHES BUCCO-DENTAIRES : PRELEVEMENT, CULTURE ET POSSIBILITES THERAPEUTIQUES

**Thèse** : Chirurgie Dentaire, Nice, 2016, n°42-57-16-29

**Directeur de thèse** : Dr PAUL Adrien

**Mots-clés** : Cellules souches bucco-dentaires, prélèvement, culture et possibilités thérapeutiques

## **Résumé** :

Une cellule souche est une cellule indifférenciée capable d'une part de donner des cellules spécialisées en se différenciant et d'autre part de se maintenir en proliférant dans l'organisme.

Cette thèse a pour but de définir ce qu'est une cellule souche, d'énumérer tous les types de cellules souches et de les classer en fonction de leur degré de différenciation ou de leur origine.

Ce travail liste les différents sites de prélèvements des cellules souches au niveau bucco-dentaire. Nous décrivons ensuite les techniques de laboratoire pour prélever, isoler, quantifier, mettre en culture et conserver ces cellules souches en prenant comme exemple les cellules du ligament parodontal des dents extraites au CHU de Nice.

Enfin, cette thèse aborde les possibilités thérapeutiques que les cellules souches bucco-dentaires peuvent apporter, au niveau local avec la possibilité de régénérer les tissus dentaires et parodontaux mais également au niveau général avec comme exemple le diabète en soulevant les capacités immunomodulatrices de ces cellules.