

**ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTÉ**

**INSERM UMR1109**

**« Nanomédecine Régénérative Ostéoarticulaire et Dentaire »**

**THÈSE** présentée par :  
**Tunay KÖKTEN**

soutenue le : **06 Octobre 2014**

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

Discipline : Sciences du vivant

**L'innervation en ingénierie dentaire**

**THÈSE dirigée par :**

**M. LESOT Hervé**

Docteur, université de Strasbourg

**RAPPORTEURS :**

**M. MAURIN Jean-Christophe**

Professeur, université de Lyon

**M<sup>me</sup> POLIARD Anne**

Professeur, université Paris Descartes

---

**AUTRES MEMBRES DU JURY :**

**M. TENENBAUM Henri**

Professeur, université de Strasbourg

**ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTÉ**

**INSERM UMR1109**

**« Nanomédecine Régénérative Ostéoarticulaire et Dentaire »**

**THÈSE** présentée par :  
**Tunay KÖKTEN**

soutenue le : **06 Octobre 2014**

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

Discipline : Sciences du vivant

**L'innervation en ingénierie dentaire**

**THÈSE dirigée par :**

**M. LESOT Hervé**

Docteur, université de Strasbourg

**RAPPORTEURS :**

**M. MAURIN Jean-Christophe**

Professeur, université de Lyon

**M<sup>me</sup> POLIARD Anne**

Professeur, université Paris Descartes

---

**AUTRES MEMBRES DU JURY :**

**M. TENENBAUM Henri**

Professeur, université de Strasbourg

*A ma fille Ipek,*

*depuis ta naissance je suis un autre homme, tu me rends plus fort au quotidien.*

*Durant ces années de thèse, je n'ai pas toujours été présent pour panser tes blessures mais  
sache que notre avenir sera plus sûr. Je serai là pour te guider, te consoler et te réconforter.*

*Pour l'éternité je vivrai dans le seul but de t'aimer...*

*« La seule chose qui vaille la peine d'être volée, c'est un baiser à un enfant endormi »*

*Joe Houldsworth*

# Remerciements

*Si cette thèse est l'aboutissement de trois années de travaux, elle restera également dans ma mémoire comme le souvenir d'une période riche en rencontres et en événements. Je souhaite ici faire part en quelques mots de mes sentiments à l'égard des personnes qui m'ont entouré et soutenu au cours de cette période.*

*Je remercie tout d'abord la Faculté de Chirurgie Dentaire de Strasbourg et ses Doyens successifs le Professeur Y. Haikel et le Professeur C. Taddéi pour avoir financé cette thèse.*

*Mes travaux ont été effectués au laboratoire de « Nanomédecine Régénérative Ostéoarticulaire et Dentaire » (INSERM U1109) de l'Université de Strasbourg. Je tiens à exprimer au Dr N. Benkirane-Jessel, Directrice du Laboratoire, ma profonde gratitude pour m'avoir accueilli au sein de son équipe. La confiance qu'elle m'a accordée et ses encouragements qui m'ont beaucoup aidé à mener à terme ce travail.*

*Je remercie le Dr H. Lesot pour m'avoir confié ce sujet et assuré la direction scientifique de cette thèse. Sa disponibilité a permis un suivi permanent du déroulement des travaux. Je le remercie pour sa rigueur scientifique, sa confiance et ses conseils qui m'ont souvent été d'une grande utilité. Qu'il trouve en ces mots l'expression de mon entière reconnaissance.*

*Je remercie particulièrement le Pr J.-C. Maurin, Professeur des Universités à l'UFR d'Odontologie de Lyon, pour nous avoir enseigné la technique de prélèvement du ganglion trigéminal qui a été un précieux apport pour ce travail de thèse. Je suis fier de le compter parmi les membres du jury.*

*Je suis également très sensible à l'honneur que me font le Pr A. Poliard, Professeur des Universités à l'Université Paris Descartes, et le Pr H. Tenenbaum, Professeur des Universités à la Faculté de Chirurgie Dentaire de Strasbourg, en acceptant de juger cette thèse et faire partie de mon jury. Je tiens donc à les remercier vivement.*

*Je voudrais exprimer ma reconnaissance au Dr S. Kuchler-Bopp avec qui j'ai travaillé quotidiennement. Tu me faisais « peur » au début mais j'ai vite remarqué qu'au fond*



*de toi tu possèdes un grand cœur très sensible. Je suis fière d'avoir été un des membres de la « Dream Team » mais sache que tu es, à toi toute seule, une « Dream Team ». Nous les étudiants nous sommes juste tes disciples. Je te souhaite une bonne continuation et j'espère que tes futurs étudiants seront à la hauteur de tes attentes.*

*Je remercie vivement le Dr L. Keller pour m'avoir enseigné, durant ma première année de thèse, les techniques expérimentales et son savoir. Merci pour ton aide si précieuse, ta patience et ton soutien au quotidien.*

*Je remercie également le personnel technique du laboratoire : Hervé Gegout pour son assiduité dans son travail et son histologie de qualité. N'oublie pas Hervé, il faut toujours déminéraliser ! Mais aussi Arielle Ferrandon pour son soutien et avoir bataillé avec les différents fournisseurs afin de nous procurer du matériel de qualité et enfin M. Fluck pour sa bonne humeur et ses nombreuses anecdotes qui m'ont toujours fait rire.*

*Je ne saurais oublier les autres doctorants et post-doctorants de l'équipe : David merci pour ton écoute et tes conseils, Thibault, Sandy, Stéphanie et Pascale je vous remercie pour la bonne ambiance que vous procurez !*

*Et enfin, je remercie sincèrement l'ensemble du personnel de l'unité INSERM U1109.*

*Je terminerai par remercier ma famille : mes parents, mes frères et mes sœurs ainsi que ma belle-sœur qui m'ont toujours fait confiance. Ils m'ont soutenu et encouragé, même dans les moments les plus difficiles. Puisse cette thèse être à la hauteur de tout ce qu'ils ont fait pour moi !*

*Et je garde le meilleur pour la fin, ma femme Yeliz, tu es toujours là pour moi. Merci pour ton amour, ton soutien, tes encouragements et surtout ta patience !!! « Seni daima herseyden çok seveceğim... »*

*« La recherche est un processus sans fin dont on ne peut jamais dire comment il évoluera. L'imprévisible est dans la nature même de la science ».*

*François Jacob*

# TABLE DES MATIERES

|                                                                                  |           |
|----------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| Liste des figures .....                                                          | 6         |
| Abbreviations.....                                                               | 8         |
| <b>PARTIE 1 : Introduction.....</b>                                              | <b>12</b> |
| <b>PARTIE 2 : Rappels bibliographiques.....</b>                                  | <b>16</b> |
| <b>I. Odontogenèse chez la souris : .....</b>                                    | <b>17</b> |
| I.1. Phase d’histomorphogenèse épithéliale : .....                               | 19        |
| a) Stade de la lame dentaire : .....                                             | 19        |
| b) Stade du bourgeon dentaire : .....                                            | 20        |
| c) Stade du capuchon dentaire : .....                                            | 20        |
| d) Stade de la cloche dentaire : .....                                           | 21        |
| I.2. Phase de la différenciation cellulaire : .....                              | 23        |
| a) Différenciation des odontoblastes : .....                                     | 24        |
| b) Différenciation des améloblastes : .....                                      | 25        |
| I.3. Formation de la racine : .....                                              | 26        |
| I.4. L’éruption dentaire : .....                                                 | 29        |
| <b>II. L’ingénierie tissulaire dentaire et ses différentes approches : .....</b> | <b>31</b> |
| II.1. Utilisation d’un « scaffold » : .....                                      | 32        |
| II.2. Utilisation d’un « scaffold » cellularisé : .....                          | 34        |

|                                                                                   |           |
|-----------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| II.3. L'approche biomimétique : .....                                             | 36        |
| <b>III. Vascularisation et innervation dentaire : .....</b>                       | <b>40</b> |
| III.1. Vascularisation : .....                                                    | 40        |
| III.2. Innervation : .....                                                        | 42        |
| a) Mise en place de l'innervation dentaire : .....                                | 42        |
| b) L'innervation pulpaire et les différents types de fibres nerveuses : .....     | 44        |
| c) Les odontoblastes : cellules sensorielles ? .....                              | 48        |
| d) Innervation des dents issues de l'ingénierie dentaire : .....                  | 53        |
| <br><b>PARTIE 3 : Matériels et Méthodes.....</b>                                  | <b>55</b> |
| <b>I. Expérimentation animale et éthique : .....</b>                              | <b>56</b> |
| <b>II. Prélèvement des germes dentaires embryonnaires : .....</b>                 | <b>56</b> |
| <b>III. Dissociation tissulaire puis cellulaire des germes dentaires : .....</b>  | <b>57</b> |
| <b>IV. Réassociation cellulaire et culture <i>in vitro</i> : .....</b>            | <b>58</b> |
| <b>V. Prélèvement et culture <i>in vitro</i> des ganglions trijumeaux : .....</b> | <b>60</b> |
| <b>VI. Implantation : .....</b>                                                   | <b>62</b> |
| VI.1. En sous-cutané : .....                                                      | 62        |
| VI.2. En calvaria : .....                                                         | 63        |
| <b>VII. Histologie : .....</b>                                                    | <b>64</b> |
| <b>VIII. Immunofluorescence indirecte : .....</b>                                 | <b>65</b> |
| <b>IX. Microscopie électronique à transmission : .....</b>                        | <b>67</b> |

|                                                                                                                                   |            |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| <b>PARTIE 4 : Résultats.....</b>                                                                                                  | <b>69</b>  |
| <b>Chapitre 1 : Ingénierie de l'organe dentaire : développement dentaire et innervation. .</b>                                    | <b>70</b>  |
| Objectifs : .....                                                                                                                 | 71         |
| Méthodes : .....                                                                                                                  | 71         |
| Résultats et discussion : .....                                                                                                   | 72         |
| <b>Chapitre 2 : L'immuno-modulation stimule l'innervation des dents obtenues en ingénierie dentaire.....</b>                      | <b>76</b>  |
| Objectifs : .....                                                                                                                 | 77         |
| Méthodes : .....                                                                                                                  | 77         |
| Résultats et discussion : .....                                                                                                   | 78         |
| <b>Chapitre 3 : Relations cellulaires au cours de l'innervation des dents obtenues par ingénierie tissulaire. ....</b>            | <b>84</b>  |
| Objectifs : .....                                                                                                                 | 85         |
| Méthodes : .....                                                                                                                  | 86         |
| Résultats et discussion : .....                                                                                                   | 87         |
| <b>PARTIE 5 : Discussion et Perspectives.....</b>                                                                                 | <b>91</b>  |
| <b>PARTIE 6 : Annexes.....</b>                                                                                                    | <b>106</b> |
| <b>Annexe 1 : Nanofibers implant functionalized by neural growth factor as a strategy to innervate a bioengineered tooth.....</b> | <b>107</b> |
| <b>Annexe 2 : Nanostructured hybrid materials for bone-tooth unit regeneration.....</b>                                           | <b>108</b> |
| <b>Références bibliographiques : .....</b>                                                                                        | <b>110</b> |

## LISTE DES FIGURES

|                                                                                                                                                                                |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figure 1 : Photos macroscopiques de l'arc mandibulaire de souris adulte et des trois molaires qui la composent.....                                                            | 17 |
| Figure 2 : Schéma représentant l'expression des principaux gènes impliqués dans les interactions épithélio-mésenchymateuses au cours de la morphogenèse dentaire précoce. .... | 19 |
| Figure 3 : Coupes histologiques des différents stades du développement de la première molaire inférieure de souris.....                                                        | 22 |
| Figure 4 : Coupes histologiques de l'évolution des cytodifférenciations odontoblastiques et améloblastiques aux stades JE18 (A, B) et PN4 (C, D). ....                         | 23 |
| Figure 5 : Schéma représentant les grandes étapes de la différenciation des odontoblastes....                                                                                  | 25 |
| Figure 6 : Coupes histologiques d'une racine de la première molaire inférieure de souris au stade PN10.....                                                                    | 27 |
| Figure 7 : Schéma représentant le principe du « stem cell homing based approach ».....                                                                                         | 33 |
| Figure 8 : Schéma représentant le principe du « scaffold based approach ». ....                                                                                                | 35 |
| Figure 9 : Schéma représentant le principe de « l'approche biomimétique ». ....                                                                                                | 37 |
| Figure 10 : Schéma représentant l'innervation de la première molaire inférieure au cours du développement chez la souris.....                                                  | 43 |
| Figure 11 : Représentation simplifiée du ganglion trigéminal chez la souris. ....                                                                                              | 45 |
| Figure 12 : Représentation schématique montrant le rôle de la sémaphorine 7A et de la rééline au cours de l'innervation du complexe dentino-pulpaire. ....                     | 50 |
| Figure 13 : Représentation schématique de l'innervation du complexe dentino-pulpaire.....                                                                                      | 51 |
| Figure 14 : Photos macroscopiques du prélèvement des germes de la première molaire inférieure d'embryon de souris. ....                                                        | 57 |
| Figure 15 : Dissociation tissulaire puis cellulaire de la première molaire mandibulaire. ....                                                                                  | 58 |

|                                                                                                              |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figure 16 : Réassociations cellulaires réalisées à partir des germes dentaires au stade capuchon (JE14)..... | 59 |
| Figure 17 : Culture des réassociations cellulaires sur milieu semi-solide.....                               | 60 |
| Figure 18 : Photos macroscopiques du prélèvement des ganglions trijumeaux chez la souris à PN2.....          | 61 |
| Figure 19 : Implantation en sous-cutané des réassociations dentaires. ....                                   | 63 |
| Figure 20 : Implantation en calvaria des réassociations dentaires. ....                                      | 64 |
| Tableau 1 : Liste des anticorps utilisés.....                                                                | 67 |

## ABBREVIATIONS

Ach : acétylcholine

ASIC : acid sensing ionic channel

ATP : adénosine triphosphate

BDNF : brain derived neurotrophic factor

bFGF : basic fibroblast growth factor

BMP : bone morphogenetic protein

BSA : bovine serum albumin

CD : cluster of differentiation

CDHA : calcium deficient hydroxyapatite

CDMO : cellule dérivée de la moelle osseuse

CGRP : calcitonin gene-related peptide

CGS : cellule gliale satellite

Coll IV : collagène type IV

CS : cellule de Schwann

CsA : cyclosporine A

CSF-1 : colony stimulating factor-1

CSM : cellule souche mésenchymateuse

CST : complexe sensitif trigéminal

DMEM : dulbecco's modified eagle medium

DPC : dental pulp cell

DPSC : dental pulp stem cell

DRG : dorsal root ganglia

EDE : épithélium dentaire externe

EDI : épithélium dentaire interne

EGF : epidermal growth factor

ENaC : epithelial sodium channel

FBS : fetal bovine serum

FGF : fibroblast growth factor

GABA : gamma-aminobutyric acid

GAD : glutamic acid decarboxylase

GAG : glycosaminoglycane

GAP-43 : growth associated protein-43

GDNF : glial derived nerve factor

GEH : gaine épithélial de Hertwig

GFAP : glial fibrillary acidic protein

GFP : green fluorescent protein

HA : hydroxyapatite

ICR : institute for cancer research (mouse)

IFN : interféron

IL : interleukin

iPS : induced pluripotent stem cell

JE : jour embryonnaire

JEM : jonction épithélio-mésenchymateuse

LB : lymphocyte B



LC : lèvre cervicale

LT : lymphocyte T

M1 : molaire 1

MCP-1 : monocyte chemoattractant protein-1

MET : microscopie électronique à transmission

MMP : matrix metalloproteinase

NEP : nœud de l'émail primaire

NES : nœud de l'émail secondaire

NF200 : neurofilament 200

NFM : neurofilament M

NGF : nerve growth factor

NK : natural killer

NO : nitric oxide

NPY : neuropeptide Y

NT : neurotrophine

PBS : phosphate buffered saline

PDGF : platelet-derived growth factor

PDLC : peridental ligament cell

PG : prostaglandine

PLGA : poly-(lactic-co-glycolic acid)

PN : post natal

REG : réticulum endoplasmique granulaire

RS : réticulum stellaire

SDF-1 : stroma-derived factor-1

Sema : sémaphorine

Shh : sonic hedgehog

SI : stratum intermedium

SMA : smooth muscle actin

SP : substance P

STRO-1 : stromal antibody-1

Tau : tubule-associated unit

TCP : tricalcium phosphate

TERK : potassium channel

TG : trigéminial ganglion

TGF : transforming growth factor

TRAAK : potassium channel subfamily K

TRP : transient receptor potentiel

TRPV : transient receptor potentiel vanilloïdes

VEGF : vascular endothelial growth factor

VEGF-R : vascular endothelial growth factor-receptor

VIP : vasoactive intestinal peptide

WNT : wingless protein

---

# **PARTIE 1**

## **INTRODUCTION**

---

L'émergence de l'ingénierie tissulaire dentaire a été rendue possible grâce à la connaissance approfondie des différentes étapes du développement dentaire et à la mise en œuvre de techniques de réassociations cellulaires et de cultures différentes. De nombreuses équipes de recherche odontologique s'intéressent à la possibilité d'implanter une dent biologique (pour revue voir : Yen and Sharpe, 2008; Yu et al., 2008; Mantesso and Sharpe, 2009; Magloire and Couble, 2011). Pour cela, des approches complémentaires ont été développées afin de reconstituer soit des tissus dentaires (Honda et al., 2010; Huang, 2011), soit un organe dentaire dans son intégralité (Honda et al., 2008; Kuchler-Bopp et al., 2011 et références citées). Notre équipe a opté pour la régénération de l'organe dentaire dans son intégralité et, pour en étudier les contraintes biologiques et techniques, nous avons développé une approche basée sur la biomimétique et l'utilisation de cellules dentaires embryonnaires (Hu et al., 2006a). En effet, des germes dentaires de souris sont prélevés au jour embryonnaire 14 (JE14). L'épithélium dentaire est séparé du mésenchyme dentaire puis chaque tissu est dissocié en cellules isolées. Celles-ci sont ensuite réassociées pour être cultivées. A partir de ce moment, la formation de l'organe dentaire entier est obtenue en deux étapes. La première étape, *in vitro*, permet de reproduire l'histogenèse épithéliale avec la formation du nœud de l'émail primaire, la morphogenèse coronaire et l'initiation des cytodifférenciations odontoblastiques et améloblastiques (Hu et al., 2005a, b). La deuxième étape, *in vivo*, consiste à implanter en sous-cutané chez la souris adulte, les réassociations cellulaires cultivées. Cette étape permet les différenciations fonctionnelles des odontoblastes et des améloblastes, l'initiation du développement des racines et du parodonte, la vascularisation du mésenchyme et de l'organe adamantin ainsi que la minéralisation des matrices (dentine, émail et ciment) (Hu et al., 2006a; Nait Lechguer et al., 2008; 2011).

Aujourd'hui, nous pouvons dire que les dents ainsi régénérées ne peuvent pas acquérir leur fonctionnalité dans la mesure où elles ne sont pas innervées (Kuchler-Bopp et al., 2011). En effet, les fibres nerveuses de la pulpe dentaire participent à la régulation du flux sanguin, de l'inflammation *via* des interactions avec les cellules du système immunitaire, à la détection d'un stress (mécanique, chimique ou thermique) et au maintien de l'homéostasie pulpaire (Hildebrand et al., 1995; Byers and Närhi, 1999; Olgart, 1996; Byers et al., 2003). Des travaux ont été réalisés pour étudier la mise en place du réseau nerveux au cours de l'odontogenèse (Luukko, 1997; 2005; Løes et al., 2002). Il a été montré que les fibres nerveuses étaient présentes très tôt au cours du développement au niveau des futurs

emplacements dentaires (Lumsden and Davies, 1983). Cependant, l'innervation de la pulpe dentaire n'a lieu que pendant la période post-natale (Luukko et al., 2005). En effet, les fibres nerveuses entrent dans le mésenchyme dentaire qu'à partir du moment où une couche d'émail est déposée (Mohamed and Atkinson, 1983). De nombreuses molécules telles que les facteurs neurotrophiques ou encore les molécules de guidage axonal (sémaphorines, éphrines, nétrines) sont impliquées dans la mise en place de l'innervation de la pulpe dentaire (Nosrat et al., 1998; Lillesaar et al., 2001; Løes et al., 2003; Lillesaar and Fried, 2004).

Les dents régénérées après 15 jours d'implantation sont similaires à une première molaire mandibulaire au stade post-natal 4 jours (PN4) du point de vue de la sécrétion et de la minéralisation des matrices (Nait Lechguer et al., 2011). A ce stade physiologique, les fibres nerveuses innervent déjà la pulpe dentaire. L'hypothèse de l'existence d'une contrainte spécifique empêchant l'innervation des implants avait alors été émise et, pour cela des expériences préliminaires de co-implantations des réassociations cellulaires avec un ganglion dorsal rachidien (DRG) avaient été réalisées. Pour autant, ces essais n'avaient pas permis de résoudre le problème (Kuchler-Bopp et al., 2011).

L'objectif de ce travail de thèse visait donc à développer une méthode expérimentale permettant l'innervation de la pulpe dentaire des réassociations cellulaires implantées. Ce travail est construit autour de l'étude successive de quatre points complémentaires :

- Nous avons testé les capacités du ganglion nerveux responsable de l'innervation physiologique des dents à innover nos implants. Ainsi, nous avons co-implanté, en sous-cutané, des réassociations cellulaires avec un ganglion trigéminal (TG) (**Chapitre 1**).
- Des phénomènes d'immuno-modulation pouvant favoriser l'innervation (Siemionow et al., 2011), nous avons testé les effets de la cyclosporine A (CsA). Cette molécule pouvant aussi avoir des effets sur la croissance axonale, nous avons cherché à vérifier un effet direct de l'immuno-dépression par implantation chez des souris immuno-déprimées (Nude) (**Chapitre 2**).
- Dans la mesure où les axones interagissent avec d'autres cellules pour assurer leurs différentes fonctions au sein du mésenchyme dentaire, nous avons analysé les interactions des axones avec les odontoblastes, les vaisseaux sanguins (cellules endothéliales et péricytes) et les cellules gliales, dans les réassociations cellulaires implantées pour les comparer à celles qui existent

dans une première molaire mandibulaire physiologique à un stade comparable **(Chapitre 3)**.

- Enfin, la littérature montre que les cellules souches sont susceptibles de stimuler la croissance axonale et possèdent des propriétés immuno-modulatrices (Arthur et al., 2009; Uccelli et al., 2007). Ainsi, nous avons entrepris de tester ces effets en utilisant des cellules dérivées de la moelle osseuse (CDMO). Le but est de tenter de nous affranchir de l'utilisation de la CsA **(Chapitre 3)**.

---

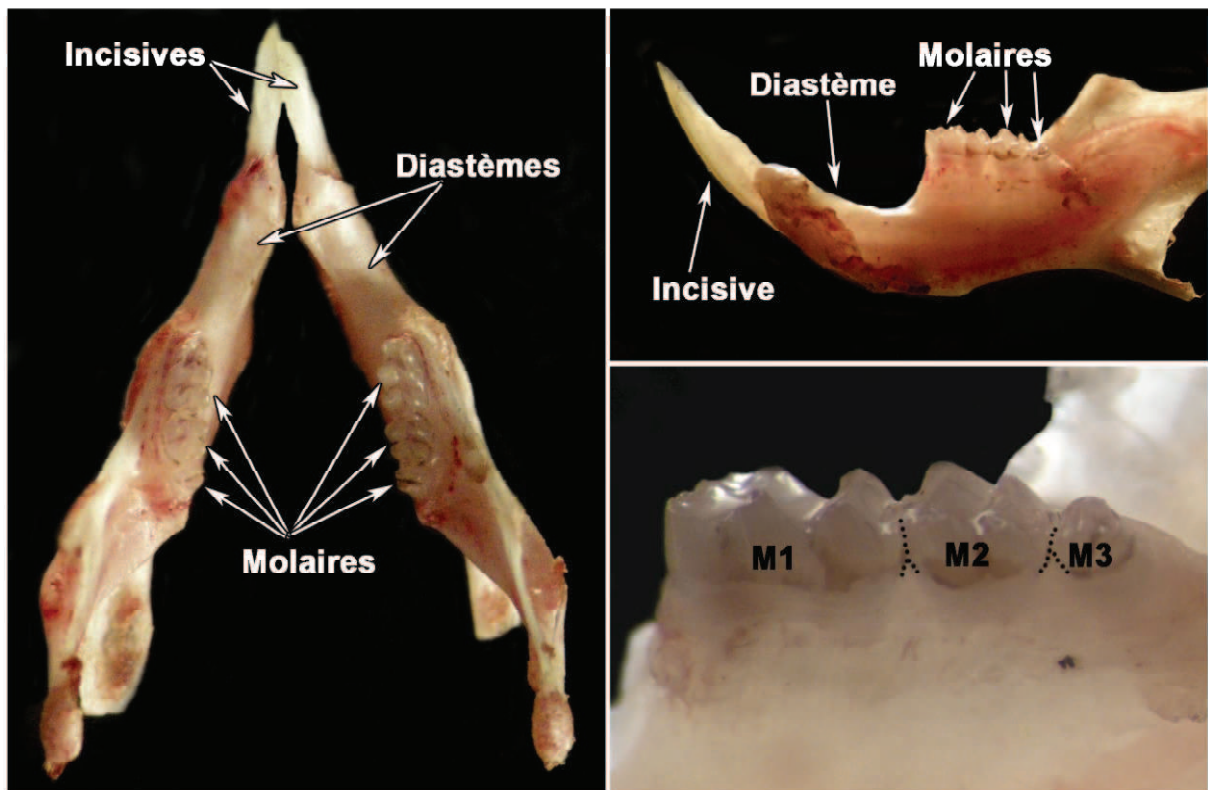
## **PARTIE 2**

# **RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES**

---

## **I. Odontogenèse chez la souris :**

Chez la souris adulte, chaque demi-mâchoire maxillaire et mandibulaire comporte une incisive à croissance continue, et trois molaires nommées M1, M2 et M3 à croissance limitée (Fig. 1).



**Figure 1 : Photos macroscopiques de l'arc mandibulaire de souris adulte et des trois molaires qui la composent.**

Les incisives sont des dents longues, fortes et monocuspidées qui se développent selon un axe antéro-postérieur où la partie la plus postérieure présente l'activité mitotique la plus élevée. Elles sont dépourvues d'émail sur leur face postérieure afin de faciliter leur usure. Les molaires sont des dents très serrées avec une couronne aplatie multicuspidée. La première molaire inférieure compte 7 cuspides alors que la première molaire supérieure en compte 8 (Piette and Goldberg, 2001). Une grande zone nommée, diastème, sépare la première molaire



(M1) de l'incisive. Il apparaît au cours de l'embryogenèse et régresse au cours du développement par apoptose (Peterková et al., 2002; 2006).

L'organe dentaire est composé d'une partie mésenchymateuse qui dérive d'une part des cellules de la crête neurale et d'autre part des cellules mésodermiques, et d'une partie épithéliale qui dérive de l'ectoderme (Chai et al., 2000; Cho et al., 2003; Miletich and Sharpe, 2004; Rothová et al., 2011). L'odontogenèse est contrôlée par des interactions séquentielles et réciproques entre ces deux parties durant l'embryogenèse (Ruch et al., 1983; Peters and Balling, 1999; Bei, 2009). Le premier signe morphologique visible du développement dentaire est l'épaississement de l'épithélium dentaire (**stade de la lame dentaire**). La lame dentaire est le premier centre de signalisation du développement dentaire. Il émet un certain nombre de signaux appartenant à quatre grandes familles de molécules de signalisation : BMP, FGF, SHH et WNT (Cobourne and Sharpe, 2005; Zhang et al., 2005; Nakatomi et al., 2006; Tummers and Thesleff, 2009; Magloire and Couble, 2011) (**Fig. 2**). A la fin de ce stade, durant l'embryogenèse, le développement dentaire se poursuit par la **phase d'histomorphogenèse épithéliale**. Cette phase est un processus multifactoriel impliquant des mécanismes d'apoptoses, de prolifération et de migrations cellulaires (Gritli-Linde et al., 2002; Peterková et al., 2003). Elle est subdivisée en plusieurs stades : lame, bourgeon, capuchon et cloche. Ensuite, le développement se poursuit par la **phase des différenciations fonctionnelles**, où les cellules mésenchymateuses et épithéliales au contact de la lame basale et à l'aide des signaux émis de façon répétée tout au long du développement dentaire, se différencient respectivement en odontoblastes et en améloblastes. La formation des racines, tardive, est initiée par la répression de certains gènes comme : FGF10 et NOTCH (Tummers and Thesleff, 2003), qui engendre la progression apicale de la lèvre cervicale au niveau de la gaine épithéliale de Hertwig. Lorsque la dentine radiculaire est élaborée, cette gaine se désintègre par apoptose, ne laissant persister que quelques îlots cellulaires (les débris épithéliaux de Malassez) autour de la racine (Rincon et al., 2006). Les cellules du sac folliculaire entourant l'ébauche dentaire, au contact de la dentine radiculaire, vont migrer à travers ces débris épithéliaux de Malassez et se différencier en cémentoblastes qui vont sécréter le cément. Le ligament périodontaire va relier la racine de la molaire par le biais de ce cément à l'os alvéolaire de la mandibule. L'ensemble : cément, ligament périodontaire et os alvéolaire constituent le parodonte, qui se développe également sous l'action d'interactions épithélio-mésenchymateuses analogues à celles qui président la formation de la couronne (Fleischmannova et al., 2010).

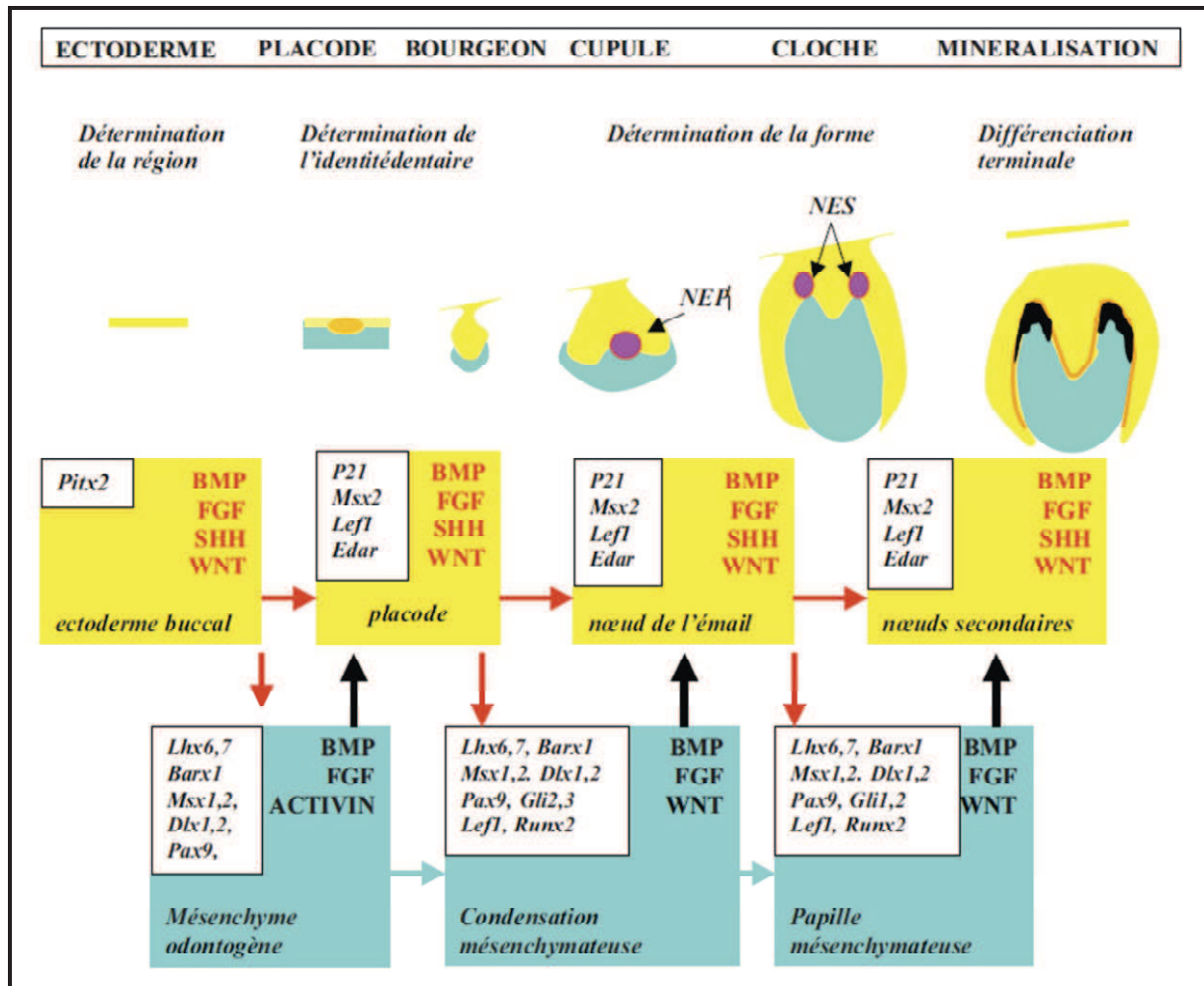


Figure 2 : Schéma représentant l'expression des principaux gènes impliqués dans les interactions épithélio-mésenchymateuses au cours de la morphogénèse dentaire précoce.

*D'après (Magloire and Couble, 2011).*

Finalement, le développement dentaire s'achève avec la **phase d'éruption** qui fait intervenir différents mécanismes comme : la sécrétion localisée d'un certain nombre de molécules de signalisation, la migration cellulaire et le remodelage osseux (Wise et al., 2002).

### I.1. Phase d'histomorphogénèse épithéliale :

#### a) Stade de la lame dentaire :

Chez la souris, c'est au 11<sup>ème</sup> jour embryonnaire (JE11) qu'apparaît la première manifestation morphologique du développement dentaire. Elle consiste en un épaississement de l'épithélium oral. C'est à cet endroit que le développement de la première molaire est

spécifié. Ces zones d'épaississement sont composées de 4 à 5 couches cellulaires que l'on nomme placode dentaire. Les fuseaux mitotiques des cellules épithéliales qui composent cette placode dentaire vont s'orienter perpendiculairement à la membrane basale. C'est à ce moment là que le premier centre de signalisation du développement dentaire est mis en place. Les cellules épithéliales vont alors émettre un certain nombre de signaux appartenant à quatre grandes familles de molécules de signalisation : BMP, FGF, SHH et WNT. Ces molécules vont agir au niveau du mésenchyme sous-jacent, qui devient alors odontogène (**Fig. 3A**).

#### **b) Stade du bourgeon dentaire :**

Ce stade correspond au 13<sup>ème</sup> jour embryonnaire (JE13) où l'épithélium de la lame dentaire s'invagine dans l'ectomésenchyme sous-jacent qui se condense. Au cours de ce stade, les cellules épithéliales s'organisent en deux populations distinctes, la première constituée de cellules basales périphériques au contact de la membrane basale et la deuxième de petites cellules rondes centrales, à l'origine du réticulum stellaire (Pourtois, 1961; Peterková et al., 1996; Lesot and Brook, 2009) (**Fig. 3B**).

#### **c) Stade du capuchon dentaire :**

Au 14<sup>ème</sup> jour embryonnaire (JE14), l'épithélium dentaire devient l'organe de l'émail lorsque son histogenèse progresse, et sa morphogenèse pour former la lèvre cervicale qui va délimiter la future pulpe dentaire. A ce stade, l'épithélium dentaire interne (EDI) composé initialement de cellules pseudo-stratifiées apparaît au contact du mésenchyme dentaire. Les cellules épithéliales périphériques du bourgeon dentaire sont à l'origine de cet EDI. Les cellules épithéliales internes du bourgeon dentaire, quant à elles, vont constituer le réticulum stellaire (RS) qui va séparer l'EDI de l'épithélium dentaire externe (EDE). Les cellules du RS sont étoilées et séparées les unes des autres par de grands espaces intercellulaires riches en glycosaminoglycanes (GAG), qui constituent une réserve énergétique pour l'organe de l'émail. L'EDE est composé d'une seule couche de cellules cubiques ayant comme origine les cellules épithéliales périphériques du bourgeon dentaire. Les cellules de l'EDI possèdent une activité mitotique plus importante que celles de l'EDE. Cette activité mitotique différentielle est impliquée dans le développement de la lèvre cervicale. Entre l'EDI et le RS, une à deux

couches de cellules épithéliales aplaties forment le stratum intermedium (SI). Les cellules du SI sont étroitement en contact avec les cellules de l'EDI (Coin et al., 1999).

Lors de la transition du stade bourgeon au stade capuchon, la différenciation spécifique d'un amas cellulaire de l'épithélium dentaire forme une structure transitoire appelée : nœud de l'émail primaire (NEP). Il est localisé au niveau de la dépression du capuchon dentaire. Ce NEP est un centre de signalisation qui joue un rôle dans la formation des cuspides dentaires (Butler, 1956; Jernvall et al., 1994; Coin et al., 1999). Deux types cellulaires composent le NEP : d'une part des cellules arrondies au centre et d'autre part des cellules concentriques en contact avec la membrane basale et en continuité avec les cellules de l'EDI (Lesot and Brook, 2009). Les cellules centrales du NEP ne prolifèrent pas et vont être éliminées par apoptose (Viriot et al., 1997; Jernvall et al., 1994; Coin et al., 1999; Obara and Lesot, 2007). Différents signaux appartenant à quatre grandes familles de molécules de signalisation sont sécrétés par les cellules du NEP : SHH, BMP, FGF et WNT (Jernvall et al., 1994; Vaahtokari et al., 1996; Jernvall et al., 1998; Hovorakova et al., 2011). Parmi ces molécules, la BMP-4 qui est également exprimée dans l'ectomésenchyme sous-jacent, induirait l'apoptose des cellules centrales du NEP (Bloch-Zupan et al., 1998; Jernvall et al., 1998) (**Fig. 3C**).

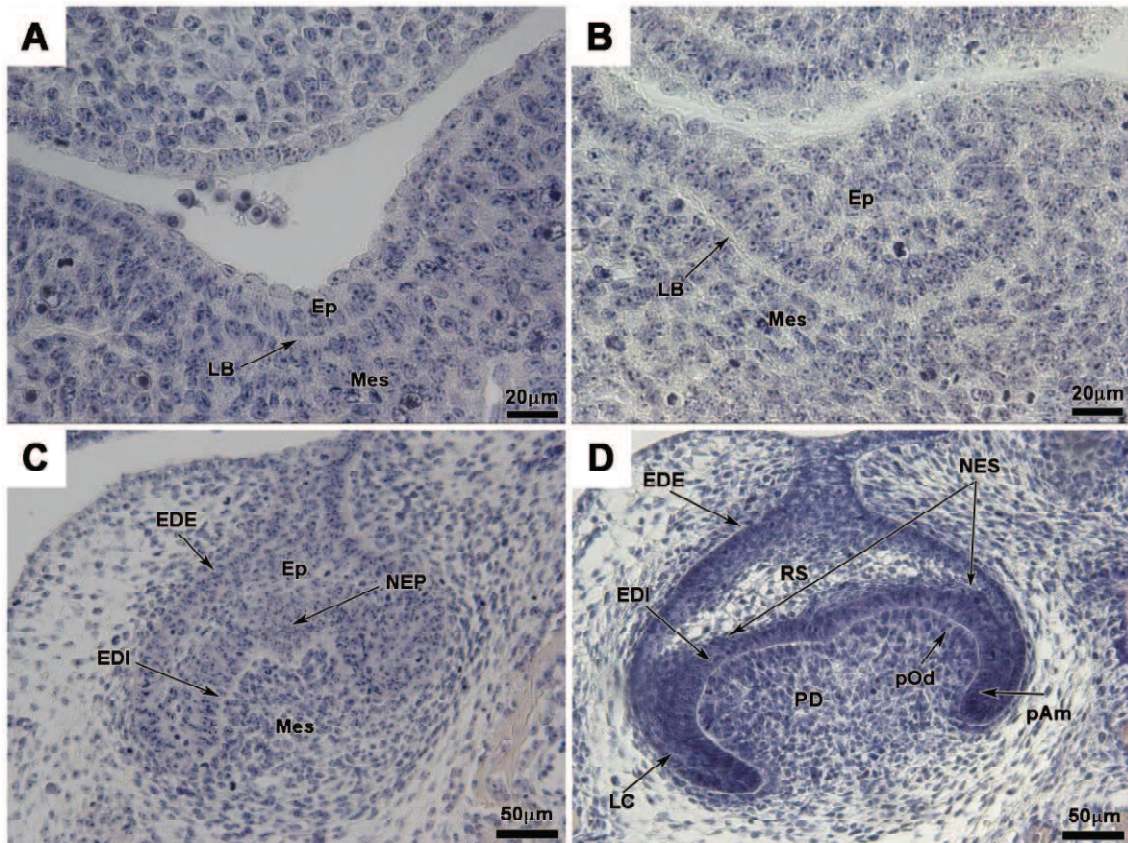
#### **d) Stade de la cloche dentaire :**

Chez la souris, c'est au 16<sup>ème</sup> jour embryonnaire (JE16) que débute ce stade. Contrairement au stade capuchon où la longueur de la première molaire inférieure ne change pas, à ce stade, la taille du germe dentaire et la forme de la jonction épithélio-mésenchymateuse vont changer simultanément. Ce changement s'accompagne d'une activité mitotique différentielle maintenue entre l'EDE et l'EDI. Dans la partie centrale de la première molaire inférieure, les cellules de l'EDI présentent un index mitotique faible. C'est dans la partie apicale de la lèvre cervicale (LC) que l'on observe l'activité mitotique la plus intense. Cette LC va poursuivre sa croissance dans le compartiment mésenchymateux afin de délimiter la pulpe dentaire (Lesot and Brook, 2009).

Dans le compartiment épithélial, des nœuds de l'émail secondaires (NES) apparaissent à l'endroit des futures cuspides de la molaire. Un des aspects du lien entre l'histogenèse épithéliale et la morphogenèse pourrait être dû à la relation qui existe entre le NEP et les NES



(Jernvall and Thesleff, 2000; Salazar-Ciudad and Jernvall, 2002). Comme le NEP, les NES sont des structures épithéliales transitoires qui sont caractérisées par leur organisation cellulaire et l'absence de divisions cellulaires. Ce sont également des centres de signalisation qui vont sécréter différents signaux. Au contact de la membrane basale et sous l'influence des différentes molécules de signalisation, les cellules épithéliales de l'EDI commencent à se différencier en pré-améloblastes et les cellules de la pulpe dentaire en pré-odontoblastes (Lisi et al., 2003) (**Fig. 3D**).



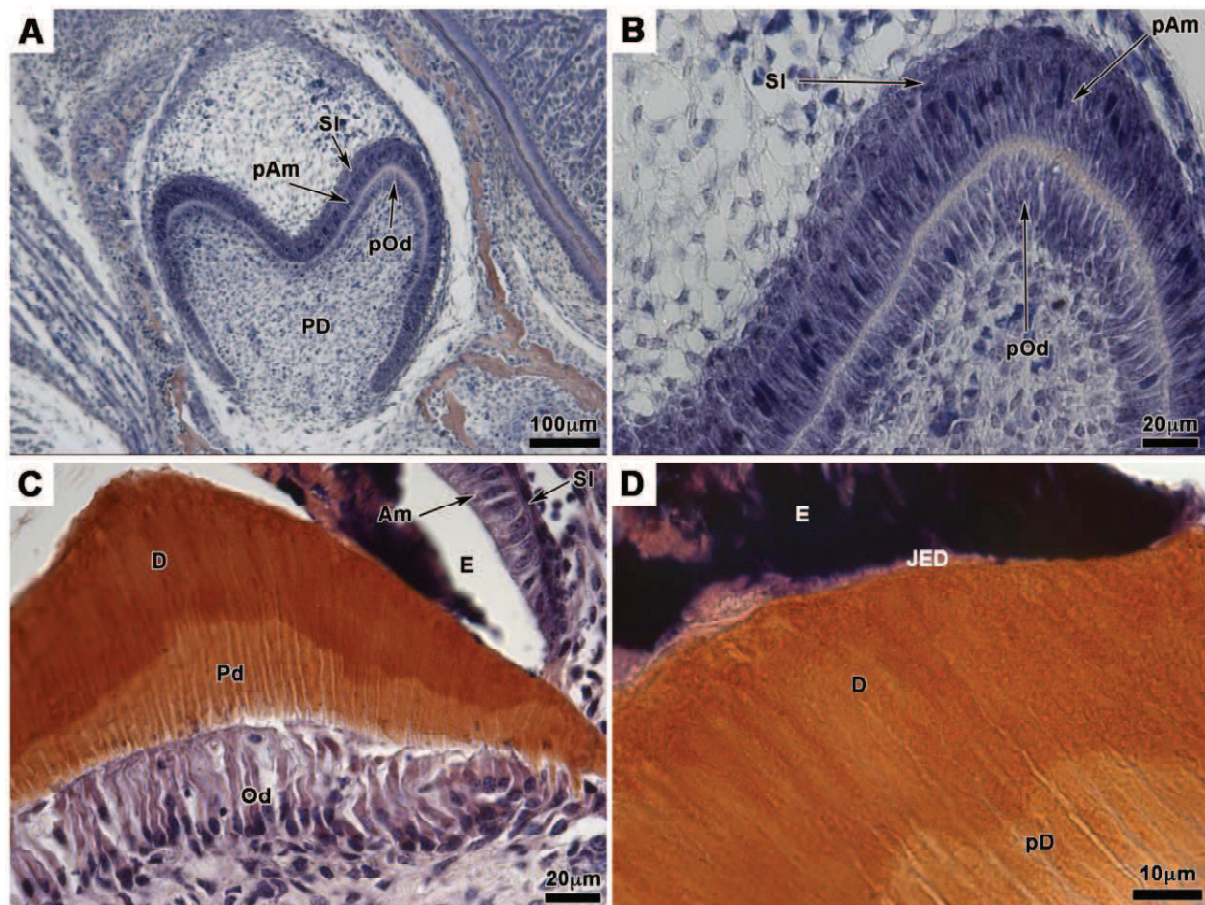
**Figure 3 : Coupes histologiques des différents stades du développement de la première molaire inférieure de souris.**

(A) stade de la lame dentaire ; (B) stade du bourgeon dentaire ; (C) stade du capuchon dentaire ; (D) stade de la cloche dentaire.

*EDE : épithélium dentaire externe ; EDI : épithélium dentaire interne ; Ep : épithélium ; LB : lame basale ; LC : lèvre cervicale ; Mes : mésenchyme ; NEP : nœud de l'émail primaire ; NES : nœud de l'émail secondaire ; pAm : pré-améloblastes ; PD : pulpe dentaire ; pOd : pré-odontoblastes ; RS : réticulum stellaire.*

## I.2. Phase de la différenciation cellulaire :

La phase de différenciation cellulaire débute au 18<sup>ème</sup> jour embryonnaire (JE18) qui correspond au stade de la cloche tardive. Elle est précédée par la disparition des NES. La différenciation terminale des odontoblastes et des améloblastes, intervient selon un schéma spatio-temporel précis (Lisi et al., 2003). Elle débute au sommet des cuspides et progresse en direction apicale jusqu'aux racines selon un gradient de différenciation (**Fig. 4**).



**Figure 4 :** Coupes histologiques de l'évolution des cytodifférenciations odontoblastiques et améloblastiques aux stades JE18 (A, B) et PN4 (C, D).

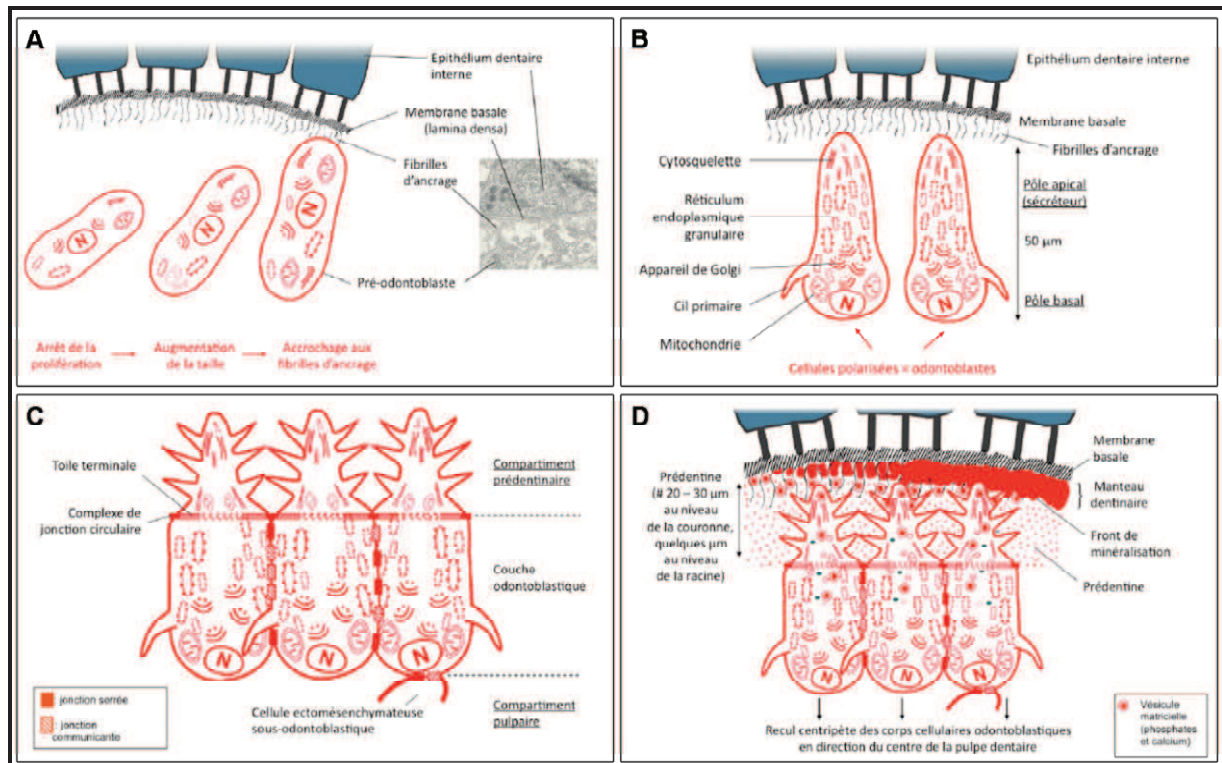
*Am :* améloblastes ; *D :* dentine ; *E :* émail ; *JED :* jonction émail-dentine ; *Od :* odontoblastes ; *pAm :* pré-améloblastes ; *pD :* pré-dentine ; *PD :* pulpe dentaire ; *pOd :* pré-odontoblastes ; *SI :* stratum intermedium.



### a) Différenciation des odontoblastes :

La première étape de la différenciation odontoblastique est l'arrêt de la prolifération cellulaire, les cellules deviennent alors post-mitotiques et augmentent de taille (pour revue voir : Ruch, 1998). Elles sont alors appelées : odontoblastes (**Fig. 5A**). Ce stade correspond au 18<sup>ème</sup> jour embryonnaire chez la souris.

Les odontoblastes vont ensuite se polariser. Leur noyau s'éloigne de la membrane basale, tandis que le réticulum endoplasmique granulaire (REG) et l'appareil de Golgi se placent en position supranucléaire. La région de la cellule où se trouve le noyau devient le pôle basal de la cellule. Les éléments du cytosquelette (microtubules, filaments intermédiaires et microfilaments) s'accumulent au pôle cellulaire proche des fibrilles d'ancrage (ou pôle apical sécréteur) et interagissent avec les constituants de la matrice extracellulaire comme la fibronectine (Ruch, 1987; Lesot et al., 1988; Ruch, 1998). Au niveau du pôle apical, un prolongement odontoblastique se forme au contact des fibrilles d'ancrage. L'allongement progressif de l'odontoblaste entraîne le recul des corps cellulaires en direction du centre de la papille ectomésenchymateuse qui prend alors le nom de pulpe dentaire (**Fig. 5B**). Le prolongement va ensuite se ramifier pour former le front de minéralisation de l'odontoblaste. Les ramifications des prolongements odontoblastiques entrent en contact avec les ramifications des prolongements adjacents. Les odontoblastes sont également liés entre eux par des jonctions serrées et jonctions communicantes et forment ainsi la couche odontoblastique (**Fig. 5C**) et deviennent sécrétoires. Les odontoblastes synthétisent et sécrètent les constituants organiques de la prédentine tels que : des sialoprotéines, des glycoprotéines non collagéniques impliquées dans la minéralisation, des protéoglycanes, des collagènes (essentiellement de type I), des phosphoprotéines et des métalloprotéinases matricielles (Cam et al., 1990; Linde and Goldberg, 1993; Palosaari et al., 2003). Ces constituants organiques sont d'abord sécrétés entre les fibrilles d'ancrage de la membrane basale, puis autour des prolongements odontoblastiques (**Fig. 5D**). Une fois sécrétée, la prédentine subit un phénomène de maturation, puis de minéralisation par dépôts de cristaux d'hydroxyapatite (Boskey, 1991).



**Figure 5 : Schéma représentant les grandes étapes de la différenciation des odontoblastes.**

(A) formation du pré-odontoblaste ; (B) polarisation odontoblastique ; (C) formation de la couche odontoblastique avec l'apparition de nombreuses jonctions intercellulaires ; (D) odontoblastes sécréteurs et leurs vésicules de sécrétion.

### b) Différenciation des améloblastes :

Au niveau de la couronne des germes dentaires, les cellules de l'EDI sortent du cycle cellulaire et se polarisent (leur noyau migre en direction du stratum intermedium) afin de se différencier en améloblastes. La dégradation de la lame basale et le contact avec la prédentine/dentine vont être à l'origine de la différenciation terminale des améloblastes (Karcher-Djuricic et al., 1985). La dégradation de la lame basale va, en effet, servir de substrat et de réservoir pour la synthèse de différents facteurs de croissance qui permettront aux cellules de l'EDI de contrôler cette différenciation du pré-améloblaste en améloblaste fonctionnel (Slavkin, 1990).

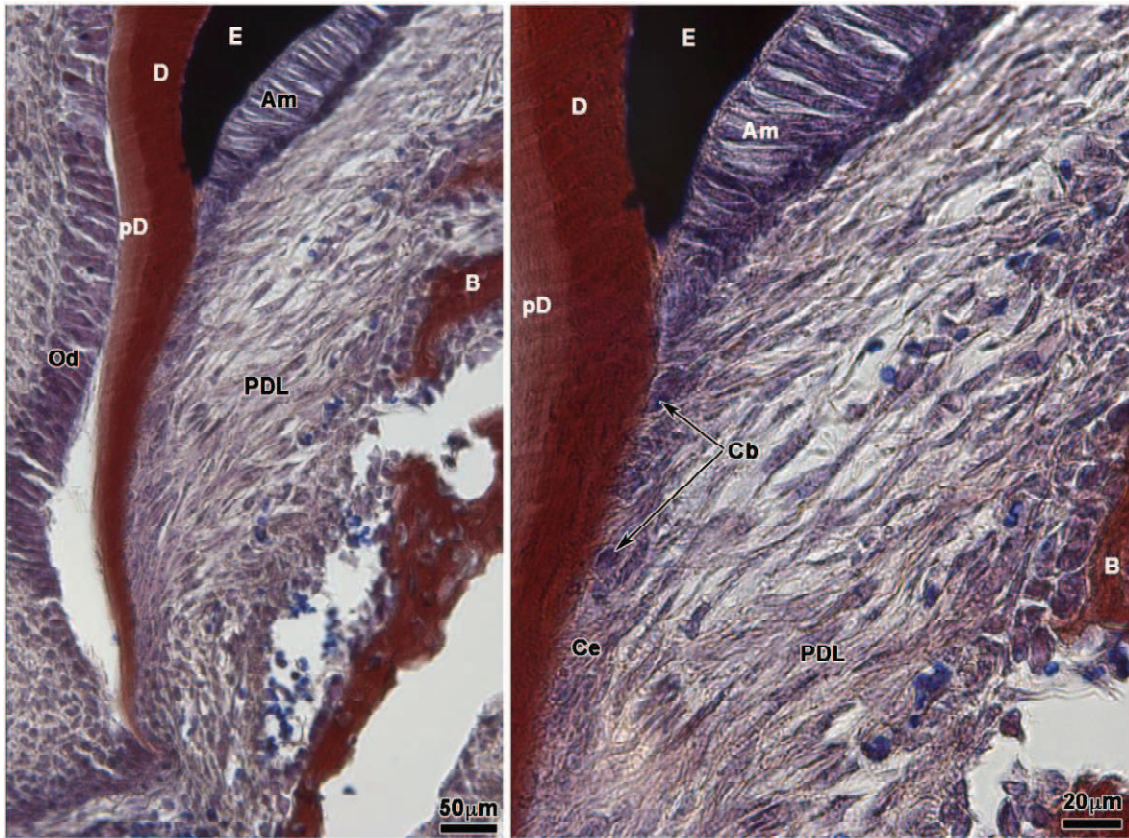
Au cours de l'amélogénèse, l'améloblaste va subir différentes phases de différenciation (Fincham et al., 1999). Il sera d'abord pré-sécréteur puis sécréteur sans



prolongement de Tomes, sécréteur avec prolongement de Tomes puis améloblaste de maturation. L'améloblaste pré-sécréteur se différencie en améloblaste sécréteur sans prolongement de Tomes après dégradation de la membrane basale. Cet améloblaste va commencer à sécréter les protéines de l'émail. Cette première couche de matrice de l'émail est sécrétée directement au contact du manteau dentinaire, elle est dite aprismatique. L'émail aprismatique va former une sorte de moule dans lequel le prolongement de Tomes va se loger. L'améloblaste devient alors sécréteur avec prolongement de Tomes. Il va sécréter l'émail prismatique immature composé : d'énameline, d'amélogénine, d'améloblastine, de tuftéline et de protéases (Robinson et al., 1995). Lorsque l'émail immature a atteint une épaisseur suffisante, l'améloblaste arrête sa sécrétion et subit le stade de transition. A ce stade, 25% des améloblastes disparaissent par apoptose. Les améloblastes restants raccourcissent et s'élargissent afin de couvrir la surface de l'émail. De plus, ces cellules perdent leur prolongement de Tomes et ne synthétisent plus de protéines de la matrice de l'émail. Ensuite l'améloblaste de maturation va permettre la maturation de l'émail. Pour cela, les améloblastes réduisent encore de taille et le nombre de leurs organites de synthèse et s'élargissent davantage. La matrice protéique est dégradée par les protéases comme la MMP-20 par exemple et le transport des ions minéraux (ions calcium et phosphate) pour la croissance des cristaux d'hydroxyapatite. Ceci entraîne la croissance en épaisseur et en largeur des cristaux d'émail qui induit sa maturation.

### **I.3. Formation de la racine :**

L'élaboration de l'organe pulpo-dentinaire radiculaire est appelée : rhizagenèse (Fig. 6).



**Figure 6 : Coupes histologiques d'une racine de la première molaire inférieure de souris au stade PN10.**

*Am : améloblastes ; B : bone (os) ; Cb : cémentoblastes ; Ce : cément ; D : dentine ; E : émail ; Od : odontoblastes ; pD : prédentine ; PDL : ligaments périodontaires.*

La rhizagenèse est en relation étroite avec la cémentogenèse qui correspond au dépôt de cément sur la surface radiculaire. Le développement des racines ne débute qu'à partir du moment où les dimensions définitives de la couronne sont acquises et que les couches d'émail et de dentine ont atteint une épaisseur suffisamment importante. La formation des racines est liée à la présence d'un tissu épithélial radiculaire particulier appelé : gaine épithéliale de Hertwig (GEH). La formation de la GEH est due au rapprochement de l'EDE et de l'EDI qui ne renferment plus que de rares cellules du réticulum étoilé (ou stellaire) et du SI au niveau de la lèvre cervicale. La GEH sépare deux zones d'ectomésenchyme : d'une part, la papille dentaire, future pulpe radiculaire, et d'autre part, la couche interne du follicule dentaire. A l'extrémité apicale de cette gaine se trouve le foramen primaire par lequel les éléments vasculaires et nerveux pénétreront dans la future pulpe dentaire. Deux types de membrane

basale circonscrivent la languette épithéliale de la GEH : une membrane basale interne (côté pulpaire) avec une apparence nette et bien définie, et une membrane basale externe (côté folliculaire) qui est plus floue et bordée de fibrilles de collagène. Les composants majeurs de ces membranes basales sont : le collagène IV, la fibronectine, la laminine et les protéoglycanes. Cette organisation confère donc à la GEH une structure en bicouche. Cette couche épithéliale bi-stratifiée va progressivement présenter des modifications de structure. En effet, sa couche externe prolonge sur une courte distance sa couche interne, tandis que la membrane basale externe contro-folliculaire se fragmente, libérant les cellules de la couche externe qui dérivent alors dans le follicule dentaire avoisinant. Ces modifications engendrent un contact direct entre la dentine radiculaire qui s'est débarrassée de la GEH et les cellules du sac folliculaire. Ce qui permet la différenciation des cellules internes du sac folliculaire en cémentoblastes (Diekwisch, 2001; Bosshardt and Nanci, 2004; Bosshardt, 2005). Le sac folliculaire est composé de trois couches distinctes :

- Une couche interne directement appliquée contre l'ébauche dentaire. Elle est composée de cellules de forme fibroblastique avec une activité mitotique importante. Elle sera à l'origine des cémentoblastes qui sécrèteront le ciment.
- Une couche intermédiaire plus épaisse et constituée d'un tissu conjonctif lâche contenant peu d'éléments cellulaires. Elle est très vascularisée et formera les fibres parodontales.
- Une couche externe mince essentiellement cellulaire et largement vascularisée en contact direct avec la crypte osseuse ou l'os alvéolaire en formation.

Les cémentoblastes sont des cellules cuboïdes présentant de fins prolongements cytoplasmiques et des caractéristiques cytologiques de cellules engagées dans la synthèse protéique. Ces cellules forment une couche discontinue, projetant des villosités vers la racine et déposent les premiers éléments de la matrice organique du ciment au contact de la mince couche de dentine radiculaire minéralisée, mais également autour des faisceaux de fibrilles ligamentaires qui s'organisent. Cette matrice organique cémentaire lorsqu'elle n'est pas encore minéralisée est appelée pré-ciment ou tissu cémentoïde. Elle est composée de substance fondamentale, de sialoprotéine osseuse, d'ostéopontine et de fibrilles de collagène intrinsèques sécrétées par les cémentoblastes et extrinsèques sécrétées par les fibroblastes (McKee and Nanci, 1996). Le ciment a ainsi une double origine : cémentoblastes et fibroblastes ligamentaires (Bosshardt, 2005). Le pré-ciment est ensuite minéralisé

progressivement par dépôt de cristaux d'hydroxyapatite. L'origine des fibres de la matrice organique (intrinsèque ou extrinsèque), la vitesse de la cémentogenèse (lente ou rapide) et le niveau de cellularisation (acellulaire ou cellulaire) de cette matrice permettent de la classer en trois groupes distincts. Selon ces trois critères, au niveau de la racine d'une même dent, on distingue cinq types de ciments : le ciment acellulaire à fibres extrinsèques qui permet l'ancrage de la dent dans son alvéole, le ciment acellulaire à fibres intrinsèques, le ciment cellulaire à fibres extrinsèques, le ciment cellulaire à fibres intrinsèques et le ciment acellulaire et afibrillaire qui ne possède pas de fonction d'attachement (Piette and Goldberg, 2001; Yamamoto et al., 2010).

#### **I.4. L'éruption dentaire :**

L'éruption dentaire est un événement post-natal. C'est le seul exemple dans la vie d'un organe (la dent) qui est présent à la naissance mais qui émerge dans les semaines (pour la souris) après la naissance, d'une crypte osseuse pour être fonctionnel. Dès 1969, Cahill (Cahill, 1969) dissocie le mouvement dentaire des mécanismes d'éruption. Il montre que pour chaque dent, il existe un « chemin » d'éruption dentaire génétiquement localisé, appelé : canal gubernaculaire. Pour qu'il y ait éruption, il est nécessaire d'avoir une résorption osseuse au niveau de ce canal. Cette résorption de l'os alvéolaire entraîne l'élargissement du canal gubernaculaire pour permettre à la couronne de se mouvoir tout en restant ancrée dans l'os alvéolaire. L'éruption dentaire permet donc d'appréhender la dynamique osseuse entre le développement dans l'os et l'émergence hors de l'os tout en gardant une attache à celui-ci. Cet événement est le résultat de nombreuses interactions entre l'organe de l'émail, les ostéoblastes, les ostéoclastes et le follicule dentaire (Wise et al., 2002). Au moment de l'éruption dentaire, l'organe de l'émail est réduit et interagit avec le follicule dentaire. Cette interaction engendre l'influx des cellules mononuclées au niveau de la partie coronaire du follicule dentaire. Ces cellules mononuclées et plus particulièrement les monocytes se différencient en ostéoclastes responsables de la résorption osseuse (Marks, 1983; Wise et al., 2002). Un autre élément nécessaire et indispensable à l'éruption dentaire est le follicule dentaire. C'est un sac de tissu conjonctif lâche qui entoure l'organe de l'émail de chaque dent. Il est destiné à élaborer le ligament parodontal, le ciment et l'os alvéolaire. Son rôle est essentiel dans l'ostéoclastogenèse et l'évolution de la dent. En effet, le follicule dentaire

permet l'éruption de la dent, d'une part, en résorbant l'os supracoronaire et d'autre part, en permettant la formation de la racine et du ligament parodontal qui est primordial pour apporter la force nécessaire à l'éruption dentaire (Moxham and Berkovitz, 1974; Marks and Cahill, 1984). L'éruption dentaire est également sous l'influence de nombreuses molécules de signalisation. Ce n'est pas un événement systémique mais plutôt un événement localisé et programmé. De part sa localisation (entre l'os alvéolaire et la dent), c'est encore une fois, le follicule dentaire qui est impliqué dans cet événement moléculaire. En effet, il sert de tissu cible pour recevoir les signaux essentiellement paracrines qui émanent du réticulum étoilé (ou stellaire) de l'organe de l'émail (Wise et al., 1992). Parmi ces molécules, les principales sont : l'EGF (epidermal growth factor) et le TGF (transforming growth factor) pour accélérer l'éruption dentaire (Cohen, 1962; Lin et al., 1992), mais aussi le CSF-1 (colony stimulating factor-1) et le MCP-1 (monocyte chemoattractant protein-1) qui sont surexprimés dans le follicule dentaire et permettent le recrutement des cellules mononuclées (Iizuka et al., 1992; Que and Wise, 1998).



## **II. L'ingénierie tissulaire dentaire et ses différentes approches :**

L'ingénierie tissulaire est un des outils, avec la thérapie cellulaire, de la médecine régénérative. Elle a pour objectif la réparation d'une lésion ou d'un organe défaillant par la création d'un nouveau tissu cellulaire fonctionnel. Cette nouvelle science en plein essor, est la résultante d'une collaboration entre différents scientifiques comme : des biologistes, des médecins ou encore des physico-chimistes.

Le domaine de la thérapie cellulaire est basé sur l'utilisation de cellules, obtenues et modifiées la plupart du temps à partir de cellules souches, afin de remplacer ou suppléer des cellules défaillantes. Le nombre de pathologies ciblées par cette biothérapie est important : Alzheimer, Parkinson, diabète, leucémie, etc...

Le domaine de l'ingénierie tissulaire est fondé sur une approche thérapeutique essentiellement biologique dont le concept de base est de produire des tissus de remplacement fonctionnels à partir de cellules souches éventuellement associées à un biomatériau servant de matrice. L'objectif est de maintenir ou d'améliorer la (les) fonction(s) du tissu ou de l'organe déficient.

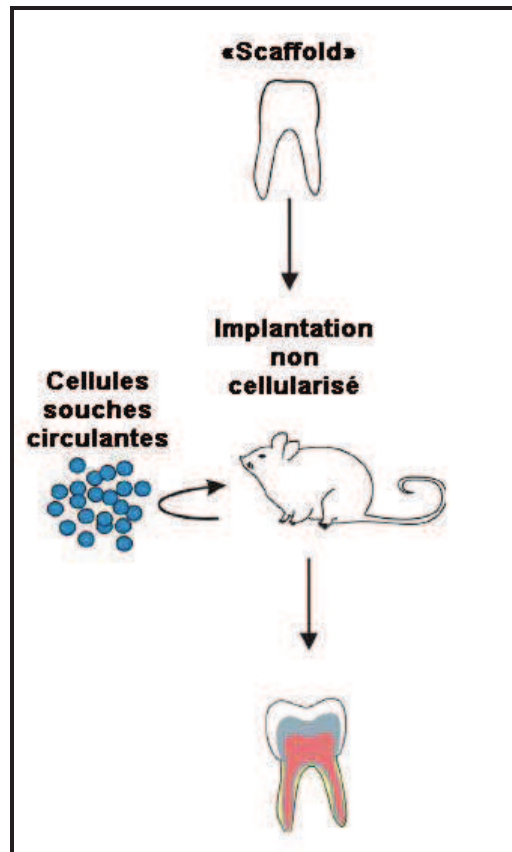
L'origine des cellules utilisées dans cette stratégie thérapeutique est diverse. Ces cellules peuvent être autologues ou souches dans le but de remédier aux problèmes liés au don d'organe et au rejet de greffe. Les cellules souches peuvent avoir une origine embryonnaire (issues d'embryons surnuméraires) ou adulte et provenir de la moelle osseuse, du tissu adipeux ou du système circulatoire. Récemment d'autres sources comme le sang de cordon ombilical et la gelée de Wharton ont été découvertes pour l'obtention non invasive de cellules souches. La capacité d'autorenouvellement et de différenciation en différents types cellulaires font, des cellules souches adultes, des candidates idéales pour la médecine régénérative.

Malgré une application clinique encore très limitée, l'ingénierie tissulaire est également appliquée à la sphère orale pour recréer des structures tissulaires manquantes ou déficientes résultant de pathologies ou de traumatismes. C'est dans cet objectif que les laboratoires impliqués dans l'ingénierie de la sphère orale se focalisent sur la recherche de stratégies expérimentales que de mise en œuvre clinique. En matière d'ingénierie dentaire, différentes approches se sont développées ces dernières années. La première approche

consiste à utiliser des biomatériaux non cellularisés afin d'attirer les cellules souches de l'hôte pour régénérer une dent. Une seconde approche, dans le même objectif, cellularise ces biomatériaux avant de les implanter. Enfin la troisième approche, également utilisée par notre laboratoire, est nommée « approche biomimétique » et consiste à régénérer, en mimant *in vitro* et *in vivo* les différentes étapes du développement dentaire, une dent entière fonctionnelle à partir de réassociations de cellules souches dentaires.

### **II.1. Utilisation d'un « scaffold » :**

L'utilisation de biomatériaux biodégradables en ingénierie dentaire permet de régénérer un tissu en trois dimensions avec une forme particulière (Ikeda and Tsuji, 2008). Ces biomatériaux peuvent être de différentes natures : constituants de la matrice extracellulaire, polymères synthétiques, ou être produits à partir de matériaux inorganiques (Kuchler-Bopp et al., 2011). L'implantation de ces biomatériaux chez l'animal sans être cellularisé au préalable visait à recruter les cellules souches mésenchymateuses circulantes pour qu'elles se différencient en cellules spécifiques du tissu correspondant. On parle alors de « **stem cell homing based approach** », (Fig. 7).



**Figure 7 : Schéma représentant le principe du « stem cell homing based approach ».**

*D'après (Steindorff et al., 2014).*

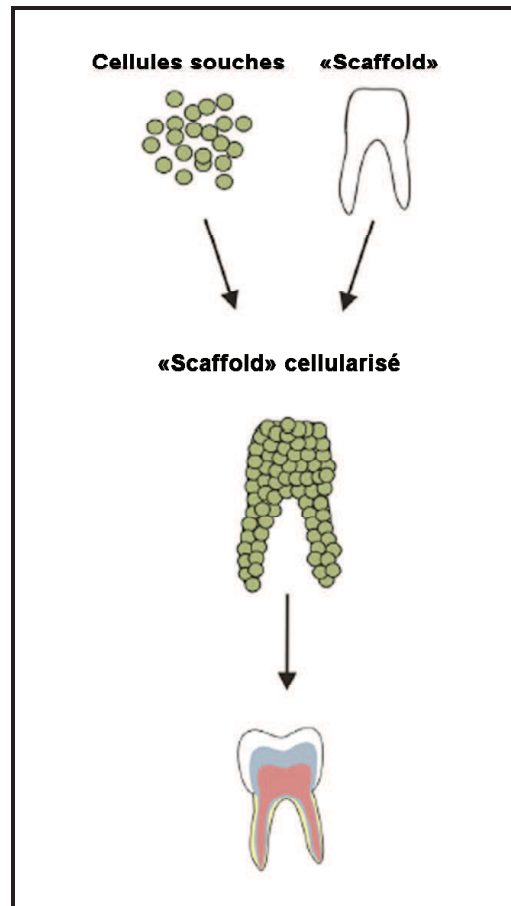
Kim *et coll.*, publient en 2010, les premiers résultats concernant la régénération de la dent et des structures périodontaires avec l'utilisation de cette approche. Pour cela, les auteurs utilisent un « scaffold » composé de 80% de polycaprolactone et 20% d'hydroxyapatite fonctionnalisé avec du SDF-1 (stroma-derived factor-1) et de la BMP-7 (bone morphogenetic protein-7) pour recruter les cellules souches et induire l'angiogenèse. Le processus angiogénique est occasionné par le SDF-1 qui est une molécule chimotactique pour les cellules de la moelle osseuse et les cellules endothéliales (Grunewald et al., 2006; Belema-Bedada et al., 2008). Alors que la différenciation des ostéoblastes est sous la dépendance de la BMP-7. Deux formes de biomatériaux ainsi fonctionnalisés sont utilisées. Le premier qui possède la forme et la taille d'une incisive de rat est implanté au niveau de l'arc mandibulaire après extraction de l'incisive de l'animal. Le second qui possède la forme et la taille d'une molaire humaine est implanté, également chez le rat, en sous-cutané au niveau dorsal. Quelque soit le site d'implantation, après plusieurs semaines, les auteurs observent la



présence de cellules et de vaisseaux dans le biomatériau fonctionnalisé. De plus, l'implantation au niveau de l'incisive permet la néoformation d'os alvéolaire et la régénération des ligaments périodontaux, mais pas de dent à proprement parlé (Kim et al., 2010). La même approche est également utilisée par Kim *et coll.*, en 2010, pour régénérer la pulpe dentaire. Dans cette étude, le biomatériau utilisé, pour donner la taille et la forme d'une dent, est d'origine naturelle puisqu'il s'agit d'une incisive (maxillaire ou mandibulaire) humaine décellularisée. Pour fonctionnaliser ce biomatériau, diverses combinaisons de molécules sont utilisées : VEGF (vascular endothelial growth factor), bFGF (basic fibroblast growth factor), BMP-7, PDGF (platelet-derived growth factor) et NGF (nerve growth factor). Ces molécules sont encapsulées dans un gel de collagène avant d'être injectées dans la pulpe et le canal radiculaire de l'incisive décellularisée. Le « scaffold » fonctionnalisé est ensuite implanté en sous-cutané au niveau dorsal chez la souris pendant trois semaines. Après implantation, les auteurs observent une cellularisation, une vascularisation et une minéralisation des tissus (présence de dentine) au sein du biomatériau. Ils remarquent que la vascularisation est primordiale pour la régénération de la pulpe dentaire et qu'elle est prioritaire par rapport à la régénération des odontoblastes. Mais sans la régénération des odontoblastes, la régénération de la pulpe dentaire est incomplète (Kim et al., 2010).

## **II.2. Utilisation d'un « scaffold » cellularisé :**

Une autre approche utilisée en ingénierie dentaire consiste à cellulariser au préalable les « scaffolds » avant de les implanter chez l'animal. Ces biomatériaux biodégradables sont généralement cellularisés avec des cellules souches dentaires ou des cellules souches adultes non dentaires. Cette approche d'ingénierie dentaire est appelée : « **scaffold based approach** », (Fig. 8).



**Figure 8 : Schéma représentant le principe du « scaffold based approach ».**

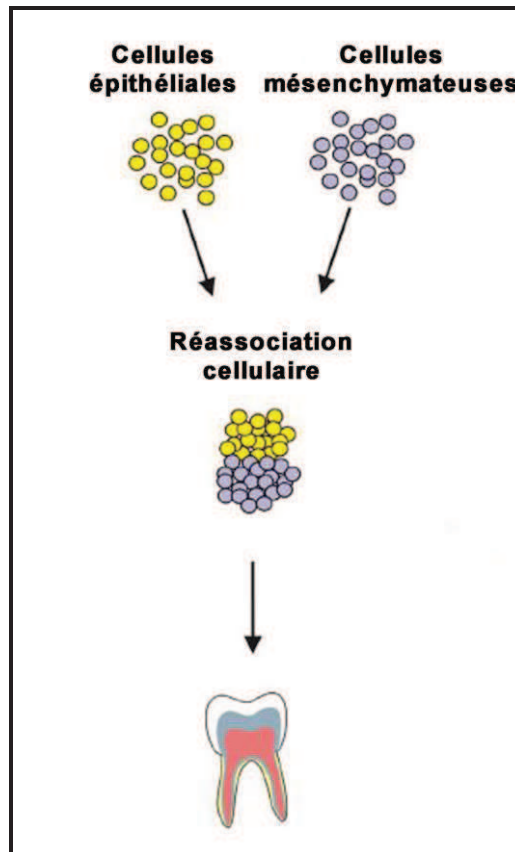
*D'après (Steindorff et al., 2014).*

Dans cette approche, les cellules souches sont isolées et amplifiées *in vitro* avant d'êtreensemencées au sein du biomatériau. Ensuite, le biomatériau cellularisé est cultivé quelques jours *in vitro* avant d'être implanté chez l'animal. Comme l'approche précédente, le « scaffold » permet de donner une taille et une forme particulière à l'implant afin qu'il puisse répondre spécifiquement aux diverses contraintes (mécaniques et/ou physiologiques) exercées au niveau du site d'implantation. Dans cette stratégie, en plus de ses caractéristiques favorables à l'adhésion cellulaire, le biomatériau doit posséder des propriétés bioactives pour favoriser la régénération de certains tissus dentaires. Ainsi Zheng *et coll.*, (2011) ont incorporé différents types de composants de phosphate de calcium dans un biomatériau à base de poly-L-lactate-co-glycolylate (PLGA) pour régénérer l'unité os/tissu. Les composants de phosphate de calcium testés sont : l'hydroxyapatite (HA), le tricalcium de phosphate (TCP) et le calcium déficient d'hydroxyapatite (CDHA). Ces biomatériaux sont cellularisés avec des cellules souches de la pulpe dentaire (DPSC) issues d'une molaire de rat de 4 jours post-natal

ou d'une molaire humaine. Une prolifération et une différenciation des DPSC sont observées. Les auteurs remarquent également une meilleure viabilité cellulaire au sein du biomatériau fonctionnalisé avec le TCP par rapport aux autres combinaisons (HA et CDHA). La fonctionnalisation au TCP permet également une meilleure différenciation cellulaire. En revanche, quelque soit le composé de phosphate de calcium incorporé au sein du biomatériau, la prolifération cellulaire est améliorée par rapport au PLGA seul. Cela est expliqué par le fait que la propriété alcaline des composés de phosphate de calcium réduit l'acidité issue de la dégradation du PLGA (Yang et al., 2006). Avec ce type de « scaffold », les auteurs parviennent à régénérer une structure pulpo-dentinaire mais n'obtiennent pas d'émail (Zheng et al., 2011). En 2013, cette stratégie est utilisée par Yang *et coll.*, pour régénérer le tissu péri-dentaire. Pour cela, les auteurs fonctionnalisent un « scaffold » à base de soie avec des nanoparticules d'hydroxyapatite (nHA). Ce dispositif est ensuite cellularisé avec des cellules du ligament parodontal (PDL) ou de la pulpe dentaire (DPC) humaines. Après culture *in vitro*, les différents types de « scaffold » (cellularisé avec PDL ou DPC) sont implantés, chez le chien, au niveau de la troisième molaire après extraction de celle-ci. Les auteurs observent une bonne adhésion et prolifération cellulaire au sein du biomatériau. Ces observations sont valables pour les deux types de cellules, ce qui révèle le caractère non toxique du nHA. De plus, la fibre de soie se dégradant très lentement, l'architecture poreuse du biomatériau est maintenue à long terme. Cette propriété du biomatériau contribue à l'amélioration de la croissance cellulaire et à la formation de nouveau tissu (Heslot, 1998). Des études soulignent le potentiel des DPC à se différencier en odontoblastes sécrétant la dentine (Wei et al., 2007) et le potentiel des PDL à former de l'os, du ciment et des ligaments péri-dentaires (Iwata et al., 2009). Mais dans cette étude, aucune différence n'est observée entre les PDL et les DPC pour la régénération des structures péri-dentaires. Les biomatériaux fonctionnalisés avec le nHA présentent une biocompatibilité favorable et une rigidité suffisante pour la régénération du tissu péri-dentaire (Yang et al., 2013).

### **II.3. L'approche biomimétique :**

Cette stratégie est basée sur la tendance des cellules à s'agréger entre elles (**Fig. 9**).



**Figure 9 : Schéma représentant le principe de « l'approche biomimétique ».**

*D'après (Steindorff et al., 2014).*

Dans cette approche qui ne fait appel à aucun biomatériaux, les interactions épithélio-mésenchymateuses sont essentielles pour le développement de l'organe dentaire dans son intégralité (Morotomi et al., 2005; Hu et al., 2005a). En ingénierie dentaire, différentes recombinaisons ont été testées afin de reproduire ces interactions : réassociations tissu/tissu, cellules/tissu ou encore cellules/cellules (Yu et al., 2008). Des réassociations hétérotypiques entre des tissus dentaires d'incisives et des tissus dentaires de molaires pris à différents stades embryonnaires chez la souris, ont permis de démontrer que la forme de la dent (molaire ou incisive) est sous le contrôle du compartiment mésenchymateux (Kollar and Baird, 1969; 1970; Hu et al., 2005b; Nait Lechguer et al., 2009). Cependant, en 2006a, Hu B. *et coll.*, ont montré qu'il est nécessaire d'avoir une grande quantité de cellules mésenchymateuses pour régénérer l'organe dentaire dans son intégralité. Ainsi, ils soulignent une des limites de cette approche (Hu et al., 2006a). D'autres limites sont révélées par Ikeda *et coll.*, en 2009, lorsqu'ils comparent les dents obtenues par cette méthode à une dent physiologique. En effet, la dent obtenue par cette stratégie est plus petite qu'une dent physiologique et il est difficile

de contrôler la morphologie de la couronne et d'orienter la dent lors d'une implantation mandibulaire par exemple (Ikeda et al., 2009). Néanmoins, cette méthodologie d'ingénierie dentaire permet de régénérer entièrement une dent et son système d'ancrage en mimant chaque étape du développement dentaire (Hu et al., 2006a). Pour cela, les réassociations dentaires doivent être cultivées *in vitro* puis implantées chez l'animal. Les cellules utilisées dans ces recombinaisons cellulaires sont généralement des cellules dentaires embryonnaires. En effet, ces cellules possèdent un potentiel odontogène plus important et des signaux essentiels au développement de l'organe dentaire, que les cellules souches dentaires au stade post-natal (Honda et al., 2008). Mais ces cellules représentent une source inappropriée pour des dents humaines et une application clinique. Néanmoins, un des challenges majeurs de l'ingénierie dentaire est de reconstituer un organe dentaire à partir de cellules souches adultes non dentaires. Ainsi, différentes sources cellulaires ont été testées (Volponi et al., 2010; Huo et al., 2010; Otsu et al., 2012; Hu et al., 2006b). Les cellules souches de la moelle osseuse et les cellules épithéliales dérivées de la muqueuse orale représentent des candidates potentielles en terme de cellules souches adultes autologues. En effet, elles ont révélé des capacités à former une dent ou différentes parties d'une dent lorsqu'elles sont stimulées de manière appropriée (Ohazama et al., 2004; Ikeda and Tsuji, 2008; Nakagawa et al., 2009).

La découverte d'une source cellulaire non-dentaire possédant des potentialités intéressantes pour l'ingénierie de l'organe dentaire permettrait le transfert de cette méthodologie à une utilisation clinique par exemple. Néanmoins, les dents créées avec les cellules dentaires embryonnaires permettent, encore actuellement, aux équipes de recherches d'approfondir leurs connaissances sur le développement dentaire et les interactions cellulaires impliquées. C'est pourquoi, avec cette approche, notre équipe vise la régénération de l'organe dentaire à partir de cellules dentaires embryonnaires de souris (Hu et al., 2005a). En effet, des réassociations cellulaires sont produites entre des cellules épithéliales et des cellules mésenchymateuses dentaires issues d'embryons de souris au stade capuchon (JE14). *In vitro*, ces réassociations reproduisent différentes étapes du développement dentaire, notamment la formation d'un NEP après quatre jours de culture seulement (Hu et al., 2005a, b). L'expression du transcrit Shh (Sonic hedgehog), l'apoptose cellulaire et l'arrêt du cycle cellulaire sont similaires au NEP formé *in situ* (Hu et al., 2005b). De plus, la présence de l'EDI, l'EDE et du SI révèlent le déroulement de l'histogenèse épithéliale. Au huitième jour de culture, la couronne dentaire et ses cuspides sont formées. A ce stade, la phase de cytodifférenciation est initiée avec la différenciation des cellules mésenchymateuses au

contact de la lame basale en odontoblastes. Les cellules de l'EDI sont encore au stade indifférencié de pré-améloblastes (Hu et al., 2005b). Ces germes dentaires cultivés sont ensuite implantés en sous-cutané chez la souris adulte. Ce passage *in vivo* permet d'initier le développement des racines et du système d'ancrage, la minéralisation matricielle et la vascularisation de la pulpe dentaire et de l'organe adamantin (Hu et al., 2006a; Nait Lechguer et al., 2008; Kuchler-Bopp et al., 2011). En revanche, aucune de ces deux étapes (*in vitro* et *in vivo*) ne permet d'innervier la pulpe de la dent régénérée (Kuchler-Bopp et al., 2011).

Le modèle utilisé et l'approche développée par notre équipe permettent de régénérer entièrement une dent avec son système d'ancrage. La vascularisation provenant de l'hôte assure la viabilité des cellules de l'organe dentaire et la minéralisation des matrices (Nait Lechguer et al., 2008; 2011). Or, même si l'innervation ne semble pas être indispensable au bon déroulement des premiers stades du développement dentaire, elle reste importante pour que la dent soit physiologiquement fonctionnelle. Il est donc primordial de trouver une méthode permettant d'innervier les dents obtenues par ingénierie.

### **III. Vascularisation et innervation dentaire :**

Au cours du développement, la pulpe dentaire est progressivement vascularisée et innervée. Le réseau vasculaire permet la croissance de l'organe dentaire, le transport d'éléments nutritifs, le maintien des cytodifférenciations améloblastiques et odontoblastiques, la minéralisation des matrices (émail et dentine), l'apport de cellules immunitaires en cas d'infection et de cellules souches pour la réparation tissulaire. Tandis que le réseau nerveux assure une certaine homéostasie pulpaire et une sensibilité pulpo-dentinaire en réponse à des stimuli mécaniques, thermiques, chimiques ou électriques. Ces deux réseaux contribuent donc à l'hétérogénéité cellulaire de la pulpe. En apportant diverses cellules, le réseau vasculaire permet le maintien, au cours du temps, de cette hétérogénéité (Keller et al., 2012).

#### **III.1. Vascularisation :**

La pulpe dentaire est un tissu richement vascularisé. La vascularisation est essentielle pour la croissance de l'organe dentaire et de ses tissus. En effet, les vaisseaux sanguins sont primordiaux pour l'apport des nutriments et les échanges métaboliques nécessaires à l'organogenèse (Thisse and Zon, 2002). Le système vasculaire dentaire se développe par deux mécanismes distincts : la vasculogenèse et l'angiogenèse. La vascularisation de la pulpe dentaire se met en place progressivement au cours du développement (Nait Lechguer et al., 2008). Elle est régulée par de multiples facteurs, tous différents les uns des autres par leur nature, leur mécanisme d'action ou leur fonction. Ces molécules sont essentiellement des facteurs de croissance tels que : TGF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ , EGF, VEGF, PDGF,...

C'est par les foramens apicaux et secondaires que les vaisseaux sanguins pénètrent dans la pulpe dentaire. Ils progressent au centre du canal radiculaire en direction de la chambre pulpaire et se ramifient progressivement pour former en périphérie un fin réseau de capillaires sous-odontoblastiques. Au niveau de la couronne, les artérioles principales se ramifient en artérioles secondaires qui se ramifient à leur tour pour former à la périphérie de la chambre pulpaire un vaste réseau de capillaires vasculaires. Cette extension vasculaire à partir de vaisseaux préexistants est appelée : angiogenèse. Ce mécanisme est également sous



la dépendance des signaux cités précédemment. A proximité des odontoblastes, les capillaires sont fenestrés afin d'assurer une meilleure diffusion des nutriments (Yoshida and Ohshima, 1996).

Le retour veineux se fait également par le foramen apical. Il est assuré par des veinules post-capillaires qui se regroupent pour former des veinules collectrices dans la partie centrale du canal radiculaire. Il existe des points de communication direct entre les veines et les artères que l'on nomme : anastomoses artério-veineuses. Ils contribuent à la régulation du débit sanguin et de la pression intra-pulpaire. Ils permettent également de dériver le flux sanguin et d'isoler une anse en cas de lésion. Le débit sanguin est aussi régulé par la présence discontinue de péricytes autour des vaisseaux (Sims, 1987). Ces cellules sont localisées le long de la partie externe, au niveau de la lame basale de l'endothélium des capillaires. Elles possèdent des prolongements primaires étendus longitudinalement le long de la paroi du capillaire et des prolongements latéraux secondaires s'étendant autour du vaisseau. Le cytoplasme des péricytes contient des microtubules qui leur confèrent une fonction contractile et ainsi un rôle dans la régulation du débit sanguin (Nehls and Drenckhahn, 1993; Sims, 2000).

La présence d'un réseau lymphatique pulpaire est aujourd'hui débattue. Selon certains auteurs (Marchetti et al., 1992; Sawa et al., 1998), ce réseau prendrait naissance dans la région sous-odontoblastique. Les vaisseaux lymphatiques conflueraient vers la partie centrale et sortiraient de la pulpe par le foramen apical. Le rôle du réseau lymphatique serait de drainer l'excès de fluide interstitiel et d'apporter des cellules immunitaires dans l'organe dentaire lors d'une réaction inflammatoire. En effet, en cas d'inflammation, une augmentation de ce réseau est observée dans la pulpe dentaire humaine (Pimenta et al., 2003). Le drainage lymphatique s'effectuerait vers les ganglions sous-mentonniers et sous-mandibulaires, puis vers les ganglions cervicaux. Cependant d'autres auteurs semblent montrer l'absence de ce réseau lymphatique au sein du parenchyme pulpaire (Gerli et al., 2010; Martin et al., 2010).

Notre équipe a étudié la vascularisation des dents régénérées par sa technique de réassociations cellulaires entre des cellules épithéliales et des cellules mésenchymateuses dentaires issues d'embryons de souris au stade capuchon (JE14). Pour cela, des marqueurs spécifiques vasculaires (CD31 ou PECAM-1 et VEGF-R2) ont été recherchés au niveau des réassociations cultivées (*in vitro*) et implantées en sous-cutané, pendant deux semaines (*in vivo*) chez la souris adulte. Les résultats obtenus ont montré, qu'*in vitro*, il est possible

d'obtenir le développement d'une couronne dentaire avec le maintien des structures de type vasculaire (Nait Lechguer et al., 2008). Cependant, dans cette première étape *in vitro*, aucun vaisseau n'est détecté au niveau de la pulpe dentaire et de l'organe de l'émail. Après deux semaines d'implantation (*in vivo*), le développement des racines est initié et le système d'ancrage se développe. Lors de cette deuxième étape *in vivo*, à quatre jours d'implantation, des structures vasculaires positives aux anticorps dirigés contre les antigènes CD31 et VEGF-R2 sont observées autour des implants. Puis, à deux semaines d'implantation, ces vaisseaux sanguins sont retrouvés dans la pulpe dentaire et l'organe de l'émail. L'implantation chez des souris GFP révèle l'origine des vaisseaux sanguins présents dans l'organe dentaire. En effet, ces vaisseaux proviennent tous de l'hôte puisqu'ils sont tous GFP positifs. De plus, l'implantation chez les souris Nude met en évidence le fait que les vaisseaux sont plutôt impliqués dans le développement de l'organe dentaire et non pas dans son rejet. Cette vascularisation des réassociations cellulaires est indispensable puisqu'elle permet leur développement, leur croissance et la minéralisation de leurs matrices (Nait Lechguer et al., 2008).

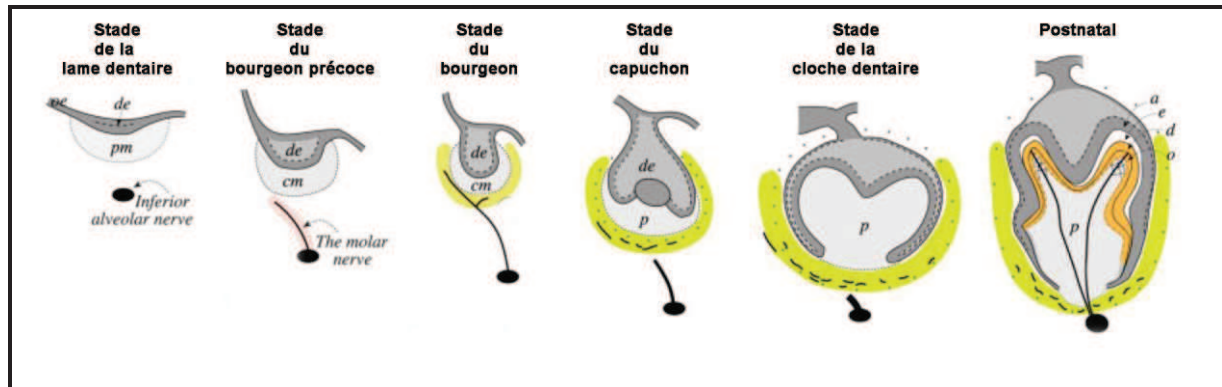
### **III.2. Innervation :**

En plus d'être richement vascularisée, la pulpe dentaire est un des tissus les plus innervés de l'organisme : on compte environ 2000 à 2500 axones au niveau de l'apex pour une prémolaire adulte humaine (Byers, 1984; Nair, 1995).

#### **a) Mise en place de l'innervation dentaire :**

Chez l'embryon de souris, la mise en place de l'innervation dentaire débute précocement au cours de l'odontogenèse. Effectivement, dès le stade de la lame dentaire (JE11), on retrouve des fibres nerveuses au niveau des futurs emplacements dentaires (Lumsden and Davies, 1983). Ces fibres s'approchent du bourgeon dentaire au 13<sup>ème</sup> jour embryonnaire (JE13) (Løes et al., 2002) et sont observées au niveau du sac folliculaire au stade du capuchon dentaire (JE14). Ce n'est qu'au stade de la cloche dentaire tardive (JE18) que les fibres nerveuses pénètrent dans la papille dentaire (Luukko, 1997; Luukko et al., 2005) (**Fig.10**). Ce stade correspond au moment où les odontoblastes deviennent fonctionnels

et produisent la pré-dentine. Le développement de l'innervation pulpaire et dentinaire est donc fortement lié au développement de la dent, et spécifiquement à certaines de ses cellules dont l'odontoblaste.



**Figure 10 : Schéma représentant l'innervation de la première molaire inférieure au cours du développement chez la souris.**

*de : dental epithelium ; oe : oral epithelium ; p : dental papilla ; pm : presumptive dental mesenchyme.*

*D'après (Luukko et al., 2005).*

Différentes molécules vont contrôler l'innervation de la dent. Ces molécules sont impliquées dans la croissance, la survie, le guidage des axones et également dans la régulation de la densité nerveuse. Parmi ces molécules de signalisation, les facteurs neurotrophiques tels que le NGF (nerve growth factor), le BDNF (brain derived neurotrophic factor), le GDNF (glial derived nerve factor), et les neurotrophines NT3 (neurotrophine de type 3) et NT4 (neurotrophine de type 4) jouent un rôle essentiel mais à différents stades du développement (Luukko, 1997; Nosrat et al., 1998; Lillesaar et al., 2001; Lillesaar et al., 2003). Cependant, l'expression de ces molécules cesse alors que l'innervation du complexe dentino-pulpaire n'est pas encore achevée. C'est à ce stade, que d'autres signaux moléculaires odontoblastiques interviennent dans la structuration terminale de cette innervation. Parmi ces molécules, la grande famille des sémaphorines semble jouer un rôle majeur dans la migration et la croissance axonale (Lillesaar and Fried, 2004). Les sémaphorines comptent actuellement une trentaine de molécules, divisées en 8 classes en fonction du degré d'homologie de leurs séquences peptidiques. Les sémaphorines de classes 3, 4, 6 et 7 concernent les vertébrés alors

que la classe 5 est retrouvée aussi bien chez les vertébrés que les invertébrés. Parmi ces différentes classes de sémaphorines, celles qui sont le plus impliquées dans l'odontogenèse sont la sémaphorine 3A (Sema 3A) définie comme un signal répulsif sur les axones et la sémaphorine 7A (Sema 7A) qui inversement est un signal attractif (Luukko, 1997; Fiore and Püschel, 2003). La plupart des sémaphorines ont comme récepteurs les plexines. La Sema 3A interagit avec la neuropiline-1 et les sémaphorines de classe 7 avec les intégrines (Kolodkin et al., 1997; Elhabazi et al., 2003; Kumanogoh and Kikutani, 2010; Hota and Buck, 2012).

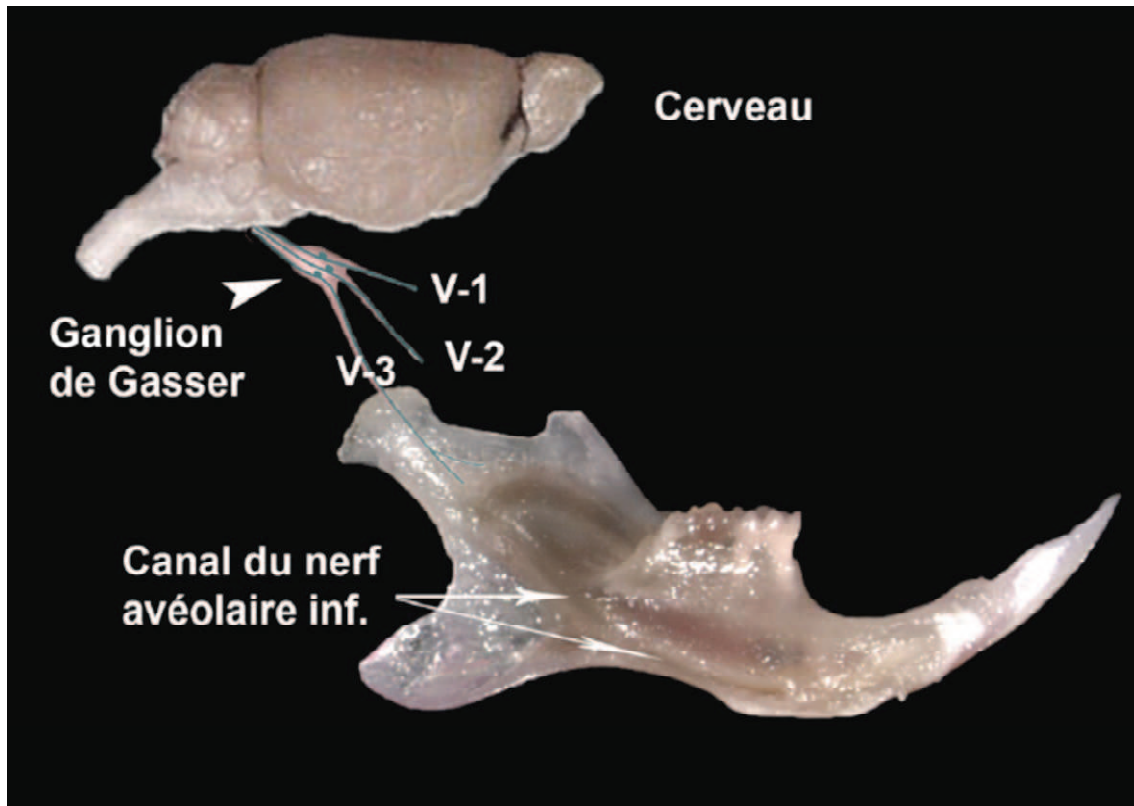
#### **b) L'innervation pulpaire et les différents types de fibres nerveuses :**

La majorité des éléments nerveux pénètre dans la dent au niveau du foramen apical et se regroupent avec les autres fibres au centre du canal radiculaire pour former de volumineux faisceaux de fibres myélinisées et amyéliniques. Ces faisceaux cheminent ensuite dans la partie centrale de la pulpe où ils se ramifient afin d'innover les zones périphériques. On observe alors, au niveau de ces zones périphériques, une importante arborisation. Cependant, la densité de l'innervation pulpaire est inégale. La partie coronaire est richement innervée par rapport à la région radiculaire. De même, les régions des cornes pulpaires qui sont également les plus sensibles ont une densité d'innervation nettement supérieure au reste de la pulpe (Lilja, 1979; Lilja et al., 1982; Gunji, 1982). Les terminaisons nerveuses sont observées dans l'ensemble de la pulpe, mais la plus forte densité est observée au voisinage des odontoblastes. Elles forment à ce niveau-là un réseau dense appelé : plexus sous-odontoblastique (ou plexus de Raschkow) (Bletsa et al., 2009; Magloire et al., 2009). Ce plexus est constitué de fibres fines, majoritairement amyéliniques ou de fibres myélinisées ayant perdu leur gaine de myéline. Si la plupart des fibres nerveuses se terminent dans ce plexus, certaines se prolongent jusqu'au pôle apical de l'odontoblaste et pénètrent dans la pré-dentine, puis dans la dentine sur une distance d'environ 200 µm (Maeda et al., 1987; Byers et al., 1987).

Deux grands types de fibres nerveuses innervent la pulpe dentaire :

- Les **fibres sensibles** sont essentiellement des neurones en « T » dont le corps cellulaire se trouve dans le ganglion trigéminal (ou ganglion de Gasser). Ce dernier, est un ganglion nerveux sensitif et moteur du nerf trijumeau. Il est situé, à la base du crâne, au niveau de la face endocrânienne antérieure du rocher de l'os temporal. Trois branches

terminales du trijumeau émergent de ce ganglion : les nerfs ophtalmique (V1), maxillaire (V2) et mandibulaire (V3) (**Fig. 11**).



**Figure 11 : Représentation simplifiée du ganglion trigéminal chez la souris.**

*V1 : nerf ophtalmique ; V2 : nerf maxillaire ; V3 : nerf mandibulaire.*

*D'après (thèse Nait Lechguer, 2010)*

Le réseau nerveux pulpaire est essentiellement constitué de fibres sensibles issues de ce ganglion trigéminal (TG). Plusieurs types cellulaires ont été décrits : des gros neurones reliés à des fibres myélinisées et des neurones plus petits reliés à des fibres amyéliniques ou faiblement myélinisées (Azérad et al., 1992; Ichikawa et al., 1995). Au niveau intra-pulpaire, on retrouve majoritairement des fibres sensibles de petit diamètre, amyéliniques (85%) ou faiblement myélinisées (15%), captant des informations chimiques, thermiques et des déformations mécaniques (Byers, 1984).

Au niveau des fibres nerveuses, les modifications de l'environnement sont détectées *via* des récepteurs spécialisés dont il existe de nombreux types. Parmi ces récepteurs, il existe

les nocicepteurs ou thermorécepteurs comme par exemple, ceux de la famille des TRP (Transient Receptor Potentiel) et notamment le TRPV1 (Transient Receptor Potentiel Vanilloïds type 1), présent en grande quantité dans la pulpe dentaire (Hermansteyne et al., 2008; Gibbs et al., 2011). Ces récepteurs captent les informations nociceptives thermiques et chimiques.

Il existe également les récepteurs ionotropiques de type ASIC (Acid Sensing Ionic Channel) qui sont sensibles à la présence des ions  $H^+$  et détectent ainsi les variations de pH. Certains récepteurs peuvent avoir une influence inhibitrice. Dans la pulpe dentaire, au niveau de la membrane des axones, les récepteurs opioïdes et GABA ont été identifiés comme des récepteurs inhibiteurs de l'activité neuronale (Mudie and Holland, 2006; Nassery et al., 2007). Les déformations tissulaires sont captées *via* des mécanorécepteurs comme ENaC, TRAAK et TRK1 et 2 présents sur les fibres pulpaire myélinisées (Hermansteyne et al., 2008).

Il existe également des récepteurs aux cytokines/chémokines. Les chémokines sont impliquées dans le contrôle des lymphocytes afin qu'ils puissent réagir aux invasions de pathogènes en interagissant avec les cellules dendritiques présentatrices d'antigènes. Certaines chémokines sont inflammatoires et sont libérées par de nombreux types cellulaires en réponse à des infections bactériennes, virales ou suite à un acte chirurgical. Leur libération est souvent stimulée par des cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-1 (Interleukine-1). Elles servent principalement de chémoattractants pour les leucocytes, monocytes/macrophages et neutrophiles, guidant ces cellules vers la lésion ou le site d'infection. Certaines chémokines inflammatoires activent des cellules qui à leur tour vont initier une réponse immunitaire ou promouvoir la réparation tissulaire. Dans la pulpe dentaire, certaines cellules comme les odontoblastes, les fibroblastes, les macrophages mais également les neurones réagissent aux agressions microbiennes en activant des récepteurs immunitaires. Ces cellules vont ensuite sécréter des cytokines (pro ou anti-inflammatoires) afin de communiquer entre-elles. Parmi ces cytokines, MCP-1 (Monocyte Chemoattractant Protein-1 ou CCL2), dont une des fonctions est d'attirer les macrophages sur le site lésionnel, joue un rôle particulier dans la douleur tant nociceptive qu'inflammatoire (Alhashimi et al., 1999; Diercke et al., 2014; Vogel et al., 2014). Au niveau des neurones nociceptifs, CCL2 est colocalisée avec les peptides impliqués dans la nociception tels que la substance P (SP) et le CGRP (Calcitonin Gene-Related Peptide) ainsi qu'avec le récepteur TRPV-1 (Park et al., 2004).



Finalement, l'activation et la sensibilisation de ces différents récepteurs vont modifier le voltage des terminaisons nerveuses et donc leur excitabilité. Les fibres qui portent ces récepteurs peuvent donc détecter des informations et les transmettre au corps cellulaire et éventuellement aux terminaisons centrales. En effet, après avoir cheminé dans les axones des neurones sensitifs primaires, les potentiels d'action sont propagés jusqu'aux extrémités centrales du neurone dans le Complexe Sensitif Trigéminal (CST) qui reçoit les informations sensibles captées par les fibres nerveuses trigéminales.

- Les **fibres du système nerveux autonome**, c'est-à-dire du système sympathique et parasympathique. Ces fibres efférentes contrôlent la vascularisation pulpaire (Kukletová et al., 1968; Olgart, 1996) et participent également aux réactions immunitaires (Haug and Heyeraas, 2006). De nombreux auteurs ont apporté les preuves histologiques et fonctionnelles d'une innervation sympathique de la pulpe dentaire chez l'homme et chez l'animal (Pohto and Antila, 1968; Avery et al., 1980; Kerezoudis et al., 1992; Fristad et al., 1994; Moe et al., 2008). Le corps cellulaire de ces fibres est situé dans le ganglion cervical supérieur. Au niveau de la pulpe dentaire, les fibres sympathiques sont plutôt situées dans les parties centrales mais elles ont également été décrites dans le plexus sous-odontoblastique et dans la couche odontoblastique, particulièrement au niveau des cornes pulpaire (Oswald and Byers, 1993; Haug et al., 2001). En revanche, ces fibres n'atteignent pas les tubules dentinaires (Shimeno et al., 2008). Elles sont souvent destinées aux vaisseaux sanguins qu'ils entourent parfois. Ainsi, elles participent à la modulation du diamètre vasculaire et ainsi du débit sanguin *via* les péricytes et cellules musculaires lisses des artérioles et des sphincters pré-capillaires. Elles exercent leur action *via* des cathécolamines comme la noradrélanine (NA) et l'adrénaline (A) mais aussi, des neuropeptides comme le neuropeptide Y (NPY) (Olgart et al., 1989; Yu et al., 2002; Rodd and Boissonade, 2003).

La présence de fibres parasympathiques cholinergiques a fait l'objet de controverses (Olgart, 1996) du fait de la non spécificité des marqueurs utilisés et l'ambiguïté des arguments fonctionnels (Sasano et al., 1995). Mais elle est maintenant établie (Casasco et al., 1990; Satoh-Kuriwada et al., 2003; Sterin-Borda et al., 2007; De Couto Pita et al., 2009) sans que l'origine des neurones cholinergiques n'ait été identifiée. En effet, Sterin-Borda *et coll.*, (2007) puis De Couto Pita *et coll.*, (2009) ont apporté les preuves fonctionnelles d'un contrôle cholinergique de l'activité vasculaire par des récepteurs muscariniques, *via* l'oxyde nitrique



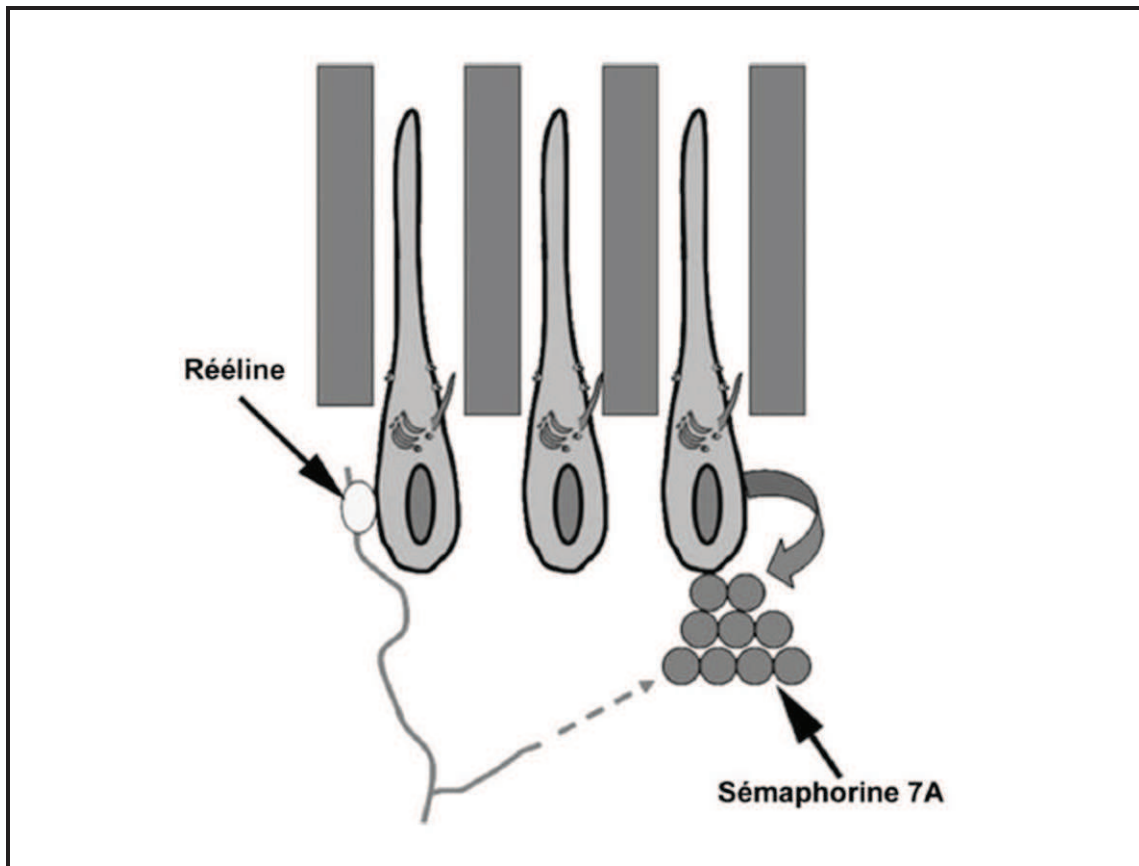
(NO) et les prostaglandines (PGs), dépendant de l'inflammation (Sterin-Borda et al., 2007; De Couto Pita et al., 2009). Ces neurones libèrent de l'acétylcholine (ACh) qui agit sur les récepteurs muscariniques. Par ailleurs, le neuropeptide VIP (Vasoactive Intestinal Peptide) exprimé dans les neurones parasympathiques a été identifié dans la pulpe dentaire (Uddman et al., 1980; Rodd and Boissonade, 2003). Les fibres nerveuses contenant du VIP cheminent le long des petits et gros vaisseaux et sont organisées en réseau autour des murs vasculaires. Cependant, au niveau de la couche sous-odontoblastique, les fibres VIP sont rares (Wakisaka et al., 1987; Fristad et al., 1998).

### **c) Les odontoblastes : cellules sensorielles ?**

L'hypothèse selon laquelle les odontoblastes seraient des cellules sensorielles a été émise depuis longtemps et renforcée par des observations récentes. En effet, comme mentionné précédemment dans le **paragraphe III.2.a**, l'expression des molécules de signalisation impliquées dans la mise en place du réseau nerveux pulpaire cesse alors que l'innervation du complexe dentino-pulpaire n'est pas encore achevée. C'est à ce stade que les odontoblastes vont intervenir : tout d'abord dans la structuration terminale de l'innervation dentaire (mise en place de l'innervation dentino-pulpaire) puis dans la perception des événements survenant au sein de la dentine *via* des canaux mécano-sensibles présents sur la membrane odontoblastique et la transmission des signaux sensoriels aux fibres nerveuses pulpaire, par un mécanisme encore inconnu.

Dans un premier temps, les odontoblastes permettent l'innervation du complexe dentino-pulpaire en sécrétant des molécules impliquées dans la croissance nerveuse. Parmi ces molécules, la sémaphorine 7A (Sema 7A) a été identifiée comme étant exprimée au cours de la différenciation odontoblastique (Buchaille et al., 2000). Au cours du développement embryonnaire, cette molécule est capable de stimuler la croissance axonale (Pasterkamp et al., 2003). En 2005, Maurin *et coll.* ont mis en évidence l'expression de cette molécule, restreinte à la couche odontoblastique dans la dent humaine. De plus, ces auteurs ont montré une corrélation entre l'expression de la Sema 7A et l'innervation de la zone odontoblastique. En effet, lorsqu'un petit nombre de fibres nerveuses est identifié au sein de la couche odontoblastique, l'expression de la Sema 7A dans les odontoblastes humains est particulièrement importante. En revanche, lorsque l'innervation de cette zone est structurée, son expression odontoblastique tend à diminuer. En outre, ces auteurs ont confirmé le rôle

attractif de cette molécule sur les fibres nerveuses. Pour cela, ils ont transfecté des cellules COS (lignée cancéreuse de cellules rénales de singes) à l'aide d'un vecteur contenant le gène codant pour la Sema 7A. Après co-culture de ces cellules avec un ganglion trigéminal de rat, ils ont observé une croissance des fibres nerveuses en direction des cellules. Ces résultats ont permis à ces auteurs d'émettre l'hypothèse que la Sema 7A, d'origine odontoblastique, pourrait-être l'une des principales molécules agissant sur les fibres nerveuses pulpaire pour permettre leur arrivée au sein de la couche odontoblastique (**Fig. 12**) (Maurin et al., 2005). Une fois le complexe dentino-pulpaire innervé, d'autres signaux sont impliqués dans le maintien des fibres nerveuses au contact des odontoblastes. Ces signaux sont portés par des molécules de la matrice extracellulaire et fournissent des informations permettant de moduler l'adhésion du nerf à son substrat. Parmi ces molécules, la rééline joue un rôle particulièrement important. La rééline est une glycoprotéine de la matrice extracellulaire, fortement exprimée au cours du développement embryonnaire et impliquée dans la mise en place de l'architecture cérébrale. Exprimée au stade adulte, elle interviendrait alors dans les phénomènes de plasticité et d'adhésion/reconnaissance entre les fibres nerveuses. Cette molécule est également exprimée au cours de la différenciation odontoblastique (Buchaille et al., 2000). En 2004, Maurin *et coll.*, ont étudié l'implication de cette molécule dans la relation nerf/odontoblaste. Pour cela, ces auteurs ont mis en évidence l'expression spécifique de la rééline dans les odontoblastes humains *in vitro* et *in vivo*. L'analyse génomique des acteurs impliqués dans la transduction du signal rééline (récepteurs VLDLR, ApoER-2 et CNR et l'adaptateur cytoplasmique Dab-1) indique une expression de ces éléments dans le ganglion trigéminal, suggérant ainsi la possibilité de réponse des fibres nerveuses pulpaire au signal rééline. Ces auteurs ont montré ensuite par une approche plus fonctionnelle le rôle de la rééline dans l'innervation dentino-pulpaire. Pour cela, ils ont réalisé des expériences de co-culture entre ganglions trigéminaux et odontoblastes différenciés. Ainsi, ils ont pu suivre *in vitro* la mise en place de la relation nerf/odontoblaste. A l'aide de ce système de co-culture, les auteurs ont mis en évidence l'arrivée des fibres nerveuses au contact des odontoblastes avec une co-localisation des molécules de rééline entre fibres nerveuses et odontoblastes (**Fig. 12**). Ils ont ainsi pu conclure que la rééline spécifiquement exprimée par les odontoblastes, est l'une des molécules impliquées dans le maintien de l'adhésion des fibres nerveuses au contact des odontoblastes (Maurin et al., 2004).



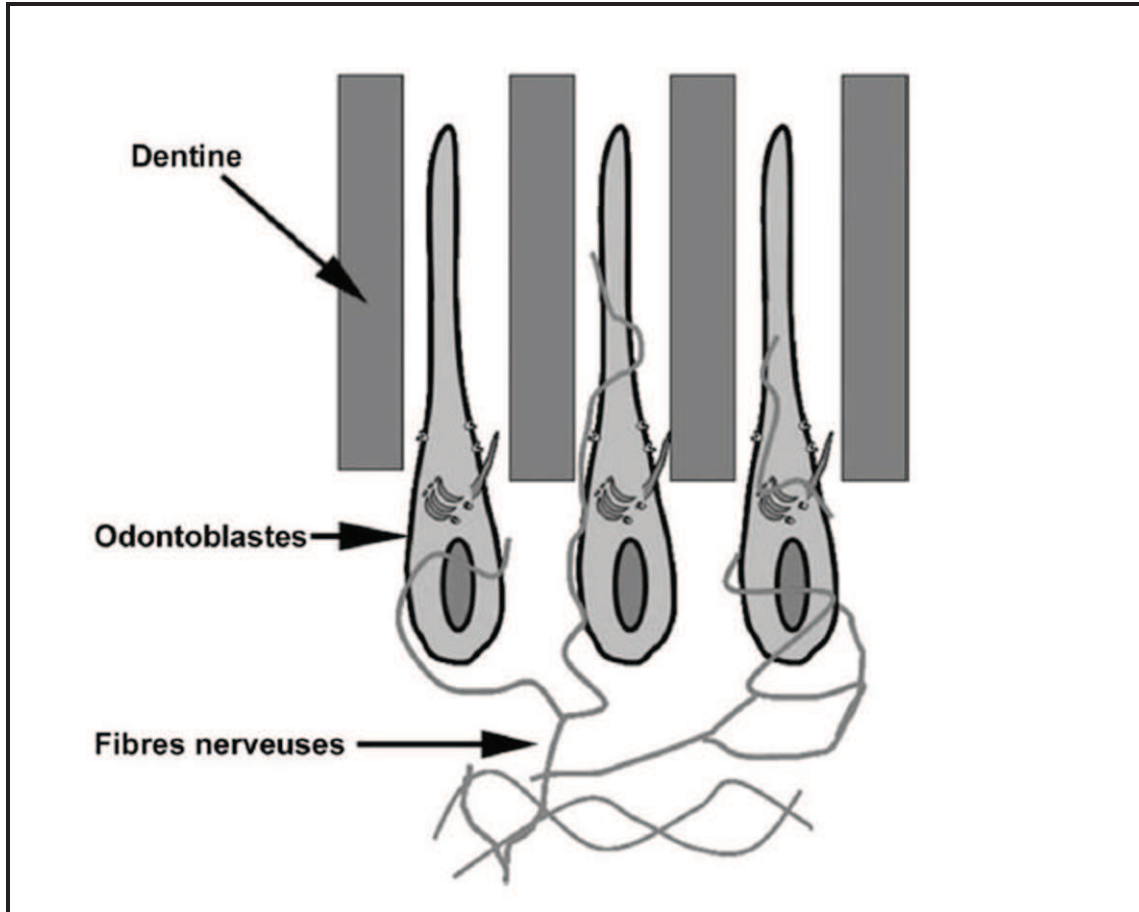
**Figure 12 : Représentation schématique montrant le rôle de la sémaphorine 7A et de la rééline au cours de l'innervation du complexe dentino-pulpaire.**

*La sémaphorine 7A est impliquée dans le guidage des fibres nerveuses pulpaire au contact des odontoblastes et la rééline dans le maintien de ces interactions.*

*D'après (Maurin, 2007).*

Après une participation active à l'innervation du complexe dentino-pulpaire, les odontoblastes vont, dans un deuxième temps, intervenir dans la perception des événements survenant au sein de la dentine et la transmission des signaux sensoriels aux fibres nerveuses pulpaire. Bien que la nature précise de la relation entre les fibres nerveuses et les odontoblastes reste encore obscure, il existe une étroite relation entre ces cellules qui suggère de possibles interactions pour la transmission des signaux. En effet, lorsque l'innervation du complexe dentino-pulpaire est achevée, les odontoblastes se retrouvent enserrés dans un réseau dense de fibres nerveuses sensorielles. Ces fibres nerveuses amyéliniques entourent les

corps cellulaires odontoblastiques et les prolongements cellulaires à l'intérieur des canalicules (**Fig. 13**) (Ibuki et al., 1996).



**Figure 13 : Représentation schématique de l'innervation du complexe dentino-pulpaire.**

*Les fibres nerveuses amyéliniques entourent les corps cellulaires des odontoblastes et certaines cheminent à l'intérieur des tubules dentinaires au contact des prolongements cellulaires.*

*D'après (Maurin, 2007).*

Les odontoblastes disposent sur leur membrane, de capteurs mécaniques ou chimiques susceptibles de percevoir les variations du microenvironnement (changement des concentrations de calcium par exemple). Ces capteurs peuvent être correspondre à des canaux ioniques mécano-sensibles. Ces canaux sont des complexes protéiques impliqués dans la

transduction de stimulations mécaniques en signaux électriques. Ils sont généralement activés par un étirement membranaire.

Parmi ces capteurs, il existe par exemple les canaux ioniques de type TREK-1 (ou KCNK2 : Potassium channel subfamily K member 2). En conditions physiologiques, ces canaux sont ouverts. Ils sont activés par des stimulations physiques et/ou chimiques comme l'étirement membranaire, l'acidose intracellulaire, la chaleur, les acides gras polyinsaturés. Cette activation entraîne une entrée d'ion  $K^+$  dans la cellule. Ces canaux ont été préalablement identifiés dans le système nerveux central. Dans la dent humaine, leur expression a été fortement observée sur la membrane des odontoblastes coronaires. Elle est absente dans les odontoblastes radiculaires (Magloire et al., 2003). Ce schéma d'expression a été corrélé avec la distribution des fibres nerveuses pulpaire (la pulpe coronaire étant plus innervée que la pulpe radiculaire : (Lilja, 1979; Lilja et al., 1982; Gunji, 1982)). Ces résultats suggèrent un rôle des canaux TREK-1 dans la génération de signaux en direction des fibres nerveuses et en réponse à des stimulations thermiques ou mécaniques de l'odontoblaste.

La membrane des odontoblastes possède également des capteurs sous forme de canaux potassiques ( $K_{Ca}$ ) activés par l'augmentation intracellulaire de calcium. L'ouverture des canaux  $K_{Ca}$  entraîne une sortie des ions  $K^+$  de la cellule. En 2000, Allard *et coll.*, ont décrit et localisé ces canaux. *In vitro*, par une technique d'électrophysiologie appelée « Patch Clamp », ils ont montré l'aspect mécano-sensible de ces canaux. En effet, une pression négative ou un choc osmotique au saccharose appliqué sur la membrane odontoblastique, entraîne leur ouverture. Ainsi, sous l'effet d'une stimulation mécanique ou chimique l'activation de ces canaux provoquant une augmentation extracellulaire d'ions  $K^+$  pourrait engendrer une dépolarisation des fibres nerveuses pulpaire environnantes à l'origine des sensations douloureuses perçues (Allard et al., 2000). Ces mêmes auteurs, ont identifié en 2006 des canaux sodiques voltage dépendant fonctionnels sur la membrane d'odontoblastes humains. Ils ont démontré par cette étude la possibilité des odontoblastes à générer des potentiels d'action sous l'influence de courants dépolarisants. Ainsi, l'odontoblaste peut être décrit comme une cellule excitable pouvant intégrer des signaux sensoriels provenant du milieu extérieur et susceptibles d'être transduits en signaux électriques (Allard et al., 2006).

Des récepteurs thermiques ou thermo-chimiques tels que ceux de la famille des TRP (Transient Receptor Potential) sont également exprimés au niveau de la membrane des odontoblastes (Son et al., 2009). Ces récepteurs permettent aux odontoblastes de percevoir et

de transmettre des signaux d'origine thermique. De plus, en conditions expérimentales, les odontoblastes peuvent émettre des potentiels d'action (Allard et al., 2006). Ils pourraient donc répondre directement aux mouvements des fluides et transmettre ensuite cette information (Magloire et al., 2009; Magloire et al., 2010).

Cependant, la nature précise des signaux échangés entre odontoblastes et fibres nerveuses reste encore à déterminer. En effet, en dépit d'une proximité et de contacts apparents entre ces cellules, il n'a pas été observé de synapses fonctionnelles permettant d'expliquer la transduction (Gunji, 1982; Byers, 1984). Des molécules tels que le NO (oxyde nitrique) et l'ATP (adénosine triphosphate) sont des candidats potentiels dans les échanges entre odontoblastes et fibres nerveuses (Magloire et al., 2010).

#### **d) Innervation des dents issues de l'ingénierie dentaire :**

Afin que les dents obtenues par réassociations cellulaires (entre cellules épithéliales et cellules mésenchymateuses dentaires issues d'embryons de souris au stade capuchon (JE14)) soient physiologiquement fonctionnelles, l'innervation de celles-ci est indispensable. Au laboratoire, des travaux ont été entrepris à ce sujet.

En effet, des réassociations cellulaires cultivées 8 jours, et des molaires intactes cultivées 6 jours et utilisées comme témoin, ont été implantées en sous-cutané chez des souris ICR adultes. Après deux semaines d'implantation, aucune fibre nerveuse n'est observée au niveau de la pulpe dentaire et des tissus périodontaires. Ces résultats obtenus peuvent être dû à l'absence de nerfs responsables de l'innervation de la dent.

Pour pallier ce problème, des expériences de co-cultures de molaires intactes ou de réassociations avec des DRG (Dorsal Root Ganglia) ont été réalisées. Les DRG étant utilisés comme modèle du système nerveux périphérique (Kress and Reeh, 1996; Vyklický and Knotková-Urbancová, 1996) ont été prélevés chez des embryons de souris au 10<sup>ème</sup> jour de gestation. Après 4 jours de co-culture, des axones du DRG dirigés vers les germes dentaires (molaires intactes et réassociations) ont été observés. Cependant, aucun axone ne pénètre dans la pulpe dentaire (Nait Lechguer, 2010). Les conditions de culture *in vitro* pouvant représenter une limite majeure, des germes dentaires intacts cultivés ont été co-implantés avec les DRG en sous-cutané chez des souris ICR adultes. Les résultats obtenus après deux semaines d'implantation montrent que les axones provenant du DRG atteignent les tissus péri-

implantaires de l'hôte mais n'atteignent pas la pulpe dentaire, ni même le mésenchyme périodentaire (Kuchler-Bopp et al., 2011).

Plusieurs hypothèses ont alors été émises : 1) l'existence d'une contrainte mécanique due à la formation d'une gangue autour des germes dentaires cultivés, 2) le choix du ganglion nerveux différent de celui principalement impliqué dans l'innervation de la dent (ganglion trigéminal), ou encore 3) la présence, à ce stade, de certains facteurs moléculaires qui s'opposeraient à l'arrivée des fibres nerveuses dans les tissus dentaires issus du stade capuchon.



---

## PARTIE 3

# MATERIELS ET METHODES

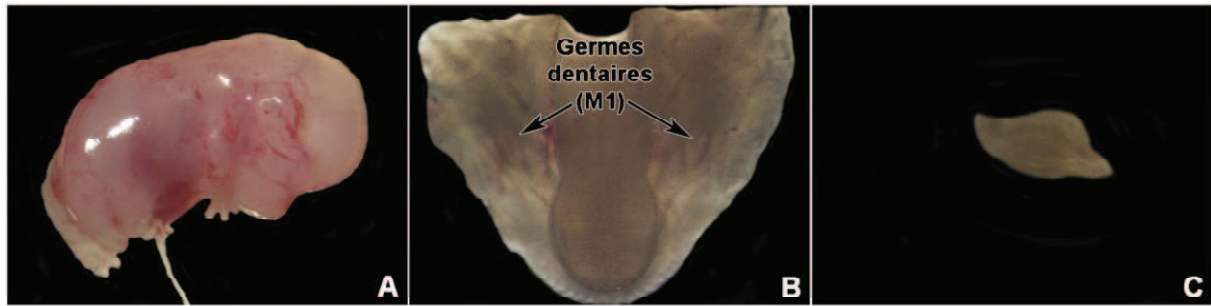
---

## **I. Expérimentation animale et éthique :**

Toutes nos expériences réalisées sur les animaux sont en accord avec les recommandations de l'Union Européenne (Directive 2010/63/EU) concernant la sécurité et le bien-être des animaux de laboratoire. Les différentes espèces de souris que nous avons utilisées pour nos expériences sont les suivantes : souris ICR (Laboratoire Charles River, l'Arbresle, France), souris ICR (Laboratoire Charles River, l'Arbresle, France) traitées à la cyclosporine (CsA) (Néoral<sup>®</sup> Novartis, Rueil-Malmaison, France) et souris Nude (NMRI-nu/nu, Janvier Labs, Saint-Berthevin, France). La CsA a été administrée par voie orale (dans l'eau du biberon) à une concentration de 1,2 mL/L, une semaine avant implantation et maintenue durant toute la période d'implantation en renouvelant l'eau tous les deux jours.

## **II. Prélèvement des germes dentaires embryonnaires :**

Après la mise en évidence du bouchon vaginal correspondant au jour 0 de la gestation, les germes dentaires ont été prélevés chez des embryons de souris ICR au 14<sup>ème</sup> jour de gestation. Pour cela, la femelle gestante a été sacrifiée par injection intrapéritonéale d'une dose létale de Pentobarbital sodique (CEVA santé animale, Centravet, Nancy, France), suivie d'une dislocation cervicale et les embryons ont été récupérés par césarienne. A l'aide de pinces chirurgicales, les têtes embryonnaires ont été décapitées et déposées dans du milieu de culture DMEM-F12 (Invitrogen, Villebon sur Yvette, France) posé sur un bac de glace. Sous un stéréomicroscope (Leica MZ 9.5, Nanterre, France), l'arc mandibulaire a été séparé de l'arc maxillaire à l'aide de scalpels. Puis les germes des premières molaires inférieures ont été isolés à l'aide de bistouris et déposés dans du milieu de culture DMEM-F12 (Invitrogen, Villebon sur Yvette, France) posé sur un bac de glace (**Fig. 14**).

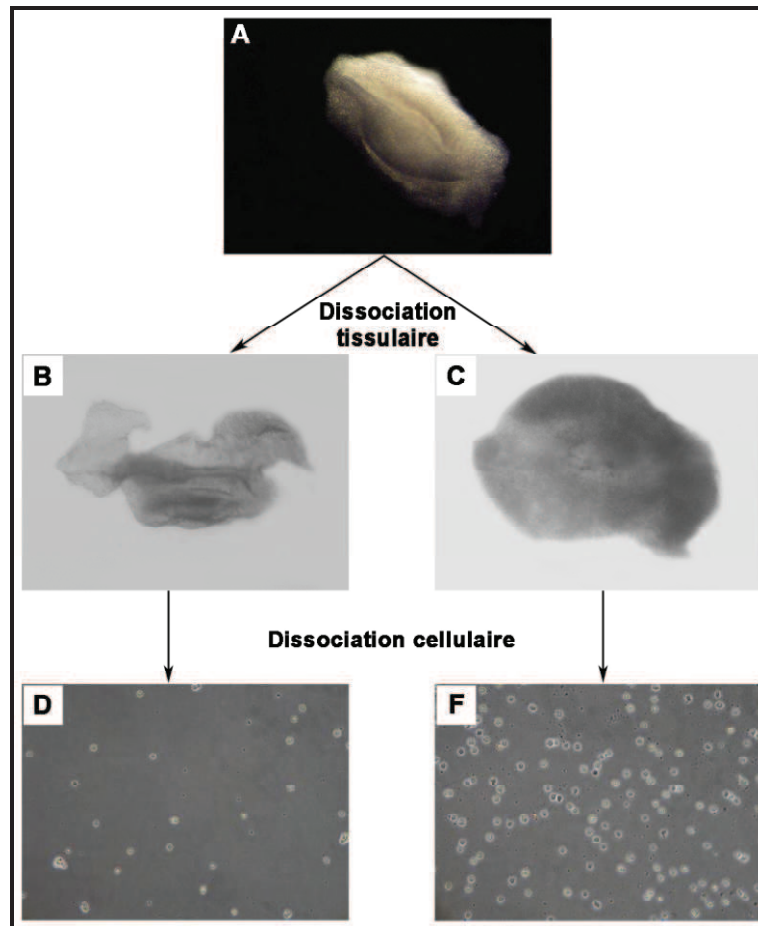


**Figure 14 : Photos macroscopiques du prélèvement des germes de la première molaire inférieure d'embryon de souris.**

*(A) Embryon de souris de 14 jours (JE14) ; (B) Mandibule avec les germes des premières molaires ; (C) Germe de la première molaire isolé.*

### **III. Dissociation tissulaire puis cellulaire des germes dentaires :**

Après prélèvement de tous les germes dentaires, le milieu DMEM-F12 a été retiré. Afin de dissocier le tissu épithélial du tissu mésenchymateux puis de dissocier chaque tissu en cellules, les germes dentaires ont été incubés dans une solution enzymatique, préchauffée à 37°C au bain-marie. Cette solution enzymatique est composée de 0,25% de trypsine (BD Bioscience, Pont de Claix, France) et de 1,2 U/mL de dispase II (Roche, Penzberg, Germany) diluées dans du DMEM-F12. Après 15 min d'incubation à température ambiante dans la solution enzymatique, les tissus épithéliaux et mésenchymateux ont été séparés mécaniquement à l'aide d'aiguilles 23G sous un stéréomicroscope. Chaque tissu (baignant toujours dans la solution enzymatique) a ensuite été déposé sur un filtre de nylon 70 µm et centrifugé à 9000 g pendant 2 min dans le but de les dissocier en cellules. Après dissociation, l'activité enzymatique a été stoppée par addition de milieu DMEM-F12 supplémenté avec 20% de FBS (PAA, Les Mureaux, France) (**Fig. 15**).



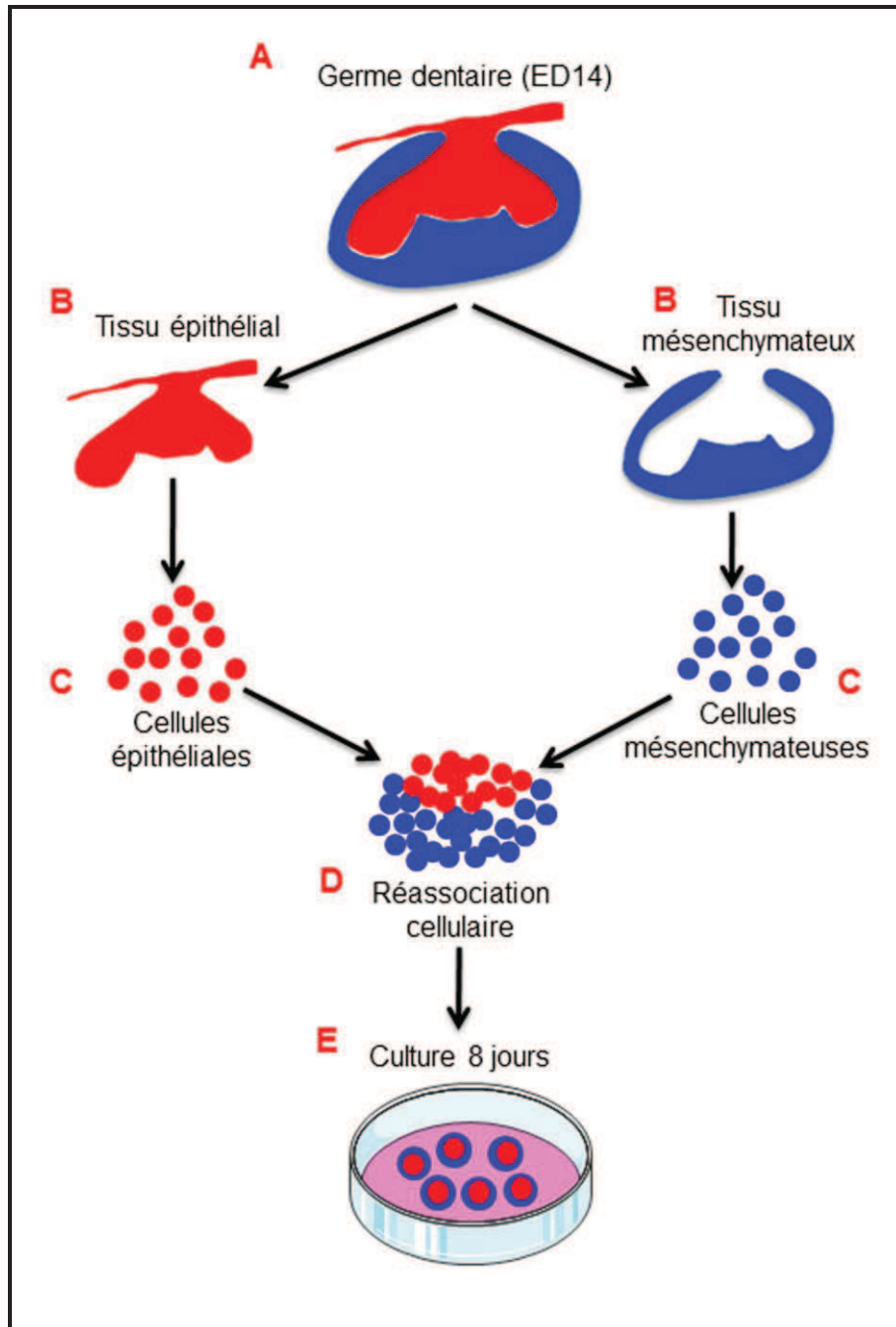
**Figure 15 : Dissociation tissulaire puis cellulaire de la première molaire mandibulaire.**

*Le germe dentaire prélevé au JE14 (A) est d'abord dissocié par traitement enzymatique et séparation mécanique en tissu épithélial (B) et mésenchymateux (C), puis chaque tissu est dissocié par traitement enzymatique et mécanique (filtre nylon 70  $\mu\text{m}$ ) en cellules épithéliales (D) et mésenchymateuses (F).*

#### **IV. Réassociation cellulaire et culture *in vitro* :**

Après dissociation tissulaire et cellulaire des germes dentaires, la suspension cellulaire épithéliale d'une part et la suspension cellulaire mésenchymateuse d'une autre part ont été centrifugées à 9000 g pendant 2 min. Une fois les culots cellulaires obtenus, le milieu DMEM-F12 supplémenté avec 20% de FBS a été retiré. Sous stéréomicroscope, à l'aide d'aiguille 23G, des amas de cellules mésenchymateuses dentaires ont été déposés sur un

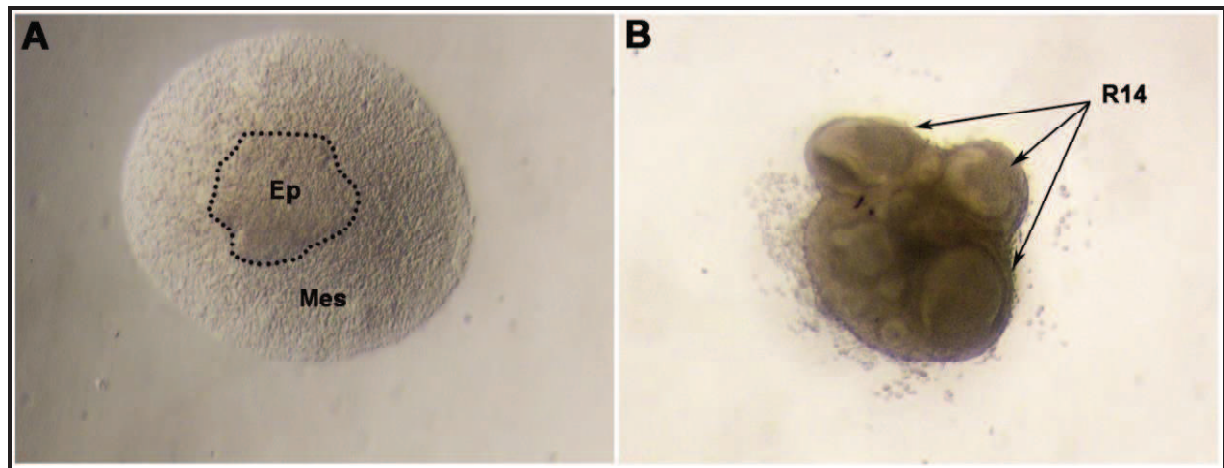
milieu semi-solide, sous forme de « colonie cellulaire ». De la même façon, les cellules épithéliales dentaires ont été déposées au centre de l'amas cellulaire mésenchymateux (Fig. 16).



**Figure 16 : Réassociations cellulaires réalisées à partir des germes dentaires au stade capuchon (JE14).**

*Les germes dentaires prélevés au JE14 (A) sont dissociés en tissus (B) puis chaque tissu en cellules (C) et ensuite ces cellules sont réassociées sur milieu de culture semi-solide.*

Les réassociations cellulaires (R14) ont ainsi été cultivées sur le milieu semi-solide pendant 8 jours (dont une nuit en co-culture avec un ganglion trigéminal dans certains cas) dans un incubateur à 37°C, sous atmosphère humidifiée à 5% de CO<sub>2</sub> (**Fig. 17**). Le milieu de culture semi-solide est composé de DMEM F-12 (Invitrogen, Villebon sur Yvette, France), 20% de FBS (PAA, Les Mureaux, France), 0,10 mg/mL d'acide ascorbique (Merck, Lyon, France), 2 mM de L-Glutamine (Invitrogen, Villebon sur Yvette, France), 50 U/mL de pénicilline-streptomycine (Invitrogen, Villebon sur Yvette, France) et 0,36% d'agar (Sigma-Aldrich, Lyon, France). Sous stéréomicroscope, tous les deux jours, les réassociations ont été placées dans une nouvelle boîte de culture à l'aide d'aiguilles 23G afin de renouveler le milieu.



**Figure 17 : Culture des réassociations cellulaires sur milieu semi-solide.**

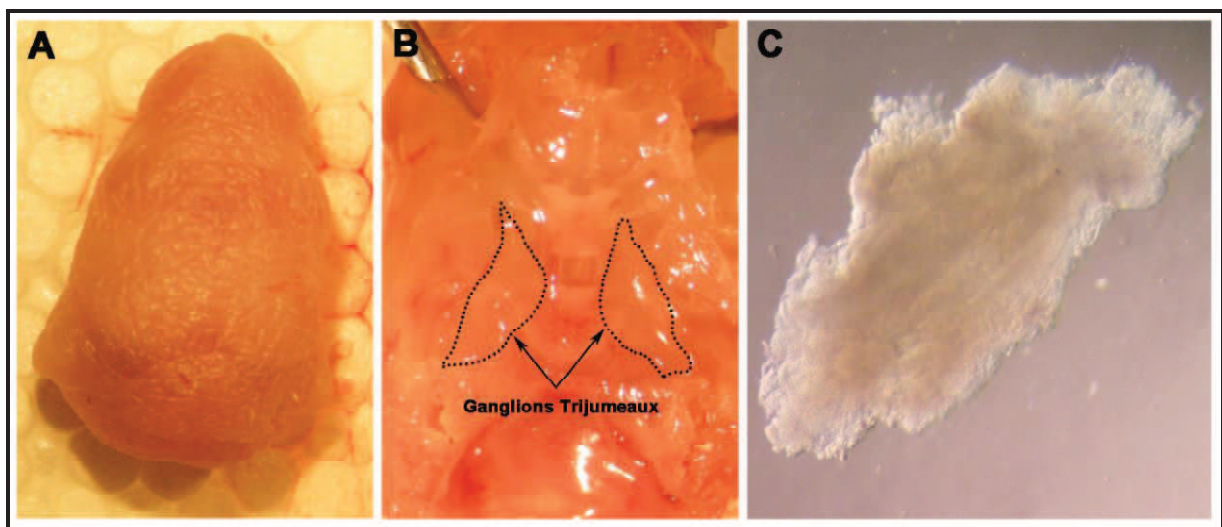
(A) R14 au jour 0 ; (B) R14 au jour 8.

## **V. Prélèvement et culture *in vitro* des ganglions trijumeaux :**

Les ganglions trijumeaux (TG pour trigeminal ganglia) ont été prélevés sous stéréomicroscope sur des souris ICR nouveau-nées âgées de 0 à 3 jours (Post-Natal 0 à 3j : PN0-3). Pour cela, le souriceau a été sacrifié par décapitation. A l'aide de ciseaux et de pinces chirurgicales, la peau et l'os du crâne ont été retirés. Le cerveau a ensuite été délicatement ôté

à l'aide d'une spatule laissant ainsi apparaître les ganglions trijumeaux. Les TG ont été sectionnés de chaque côté à l'aide de scalpels et déposés dans du milieu DMEM F-12 posé sur un bac de glace (**Fig. 18**).

A ce moment-là, les réassociations (R14) ont été regroupées par groupes de trois sur le milieu de culture semi-solide. Un ganglion trigéminal a été déposé sur chaque groupe de réassociations et cultivé ainsi sur le même milieu de culture pendant une nuit avant l'implantation.



**Figure 18 : Photos macroscopiques du prélèvement des ganglions trijumeaux chez la souris à PN2.**

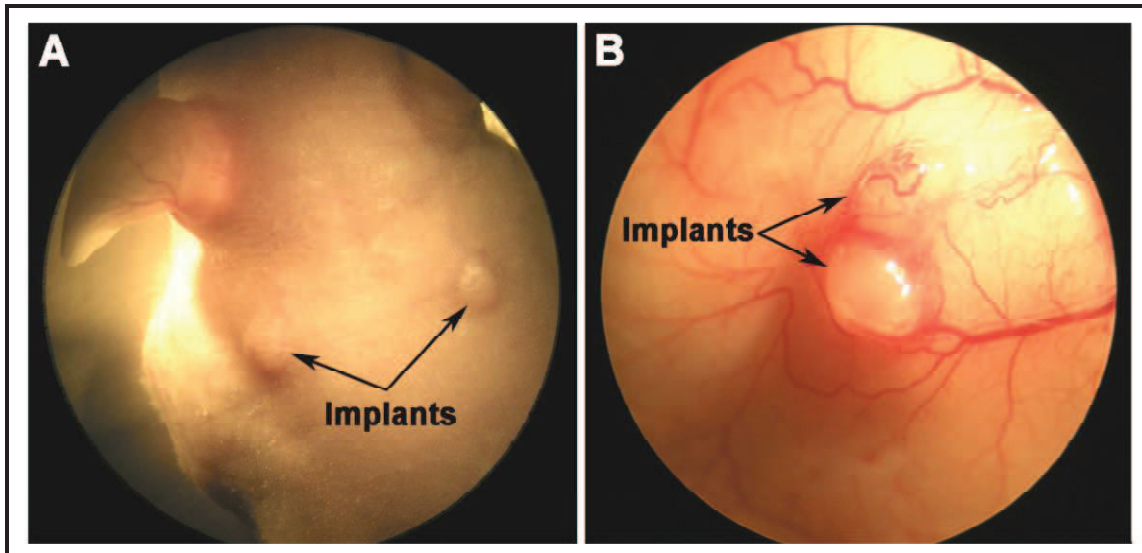
*Chez la souris au stade PN2 (A) la peau, l'os crânien ainsi que le cerveau sont retirés afin de mettre en évidence les ganglions trijumeaux (B). Les ganglions sont sectionnés de chaque côté à l'aide de scalpels et déposés dans du milieu DMEM F-12 (C) puis un TG est déposé sur chaque groupe de R14 sur milieu semi-solide.*



## **VI. Implantation :**

### **VI.1. En sous-cutané :**

Après 8 jours de culture *in vitro* (dont une nuit avec le ganglion trigéminal dans certains cas), les réassociations ont été implantées avec ou sans ganglion trigéminal en sous-cutané dans une zone située derrière l'oreille de souris ICR adultes (Laboratoire Charles River, l'Arbresle, France), ICR traitées à la CsA (Laboratoire Charles River, l'Arbresle, France) ou Nude (NMRI-nu/nu, Janvier Labs, Saint-Berthevin, France). Pour cela, les souris ont été anesthésiées par une injection intrapéritonéale d'une solution de 100 mg/kg de Kétamine (VIRBAC santé animale, Centravet, Nancy, France) et de 10 mg/kg de Xylazine (Rompun<sup>®</sup> 2%, Centravet, Nancy, France). La zone d'implantation a été désinfectée avec de l'alcool 70° après avoir coupé les poils. Une incision de la peau d'environ 0,2 à 0,3 cm a été effectuée et les échantillons ont été placés entre la peau et le muscle de l'animal. La plaie a ensuite été suturée à l'aide d'un fil chirurgical résorbable Safil Violet (B BRAUN MEDICAL S.A.S, Boulogne Billancourt, France) et de nouveau désinfectée avec l'alcool 70°. Les souris ont ensuite été surveillées jusqu'à leur réveil avant de les remettre à l'animalerie. Après une période d'implantation de 7 ou 14 jours, les implants ont été récupérés suite au sacrifice de l'animal par injection intrapéritonéale d'une dose létale de Pentobarbital sodique (CEVA santé animale, Centravet, Nancy, France) (**Fig. 19**).

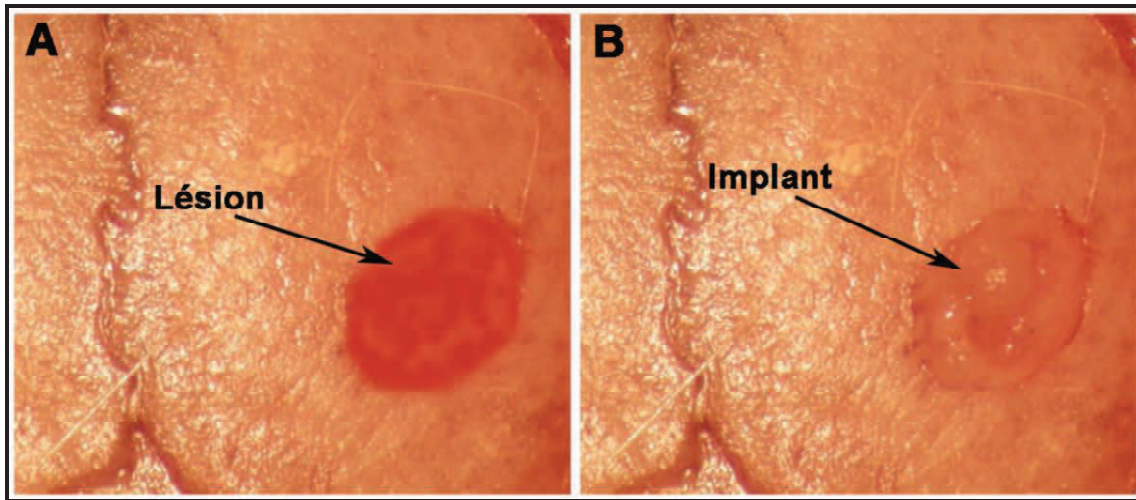


**Figure 19 : Implantation en sous-cutané des réassociations dentaires.**

*(A) zone d'implantation ; (B) implants après 2 semaines, vascularisés par l'hôte.*

## **VI.2. En calvaria :**

Pour les implantations en calvaria, les réassociations cellulaires (sans TG) ont été implantées individuellement après 8 jours de culture *in vitro*. De la même manière que les implantations en sous-cutanés, les souris ont été anesthésiées et la zone d'implantation a été nettoyée et désinfectée. Une incision de la peau a été effectuée tout le long du crâne à l'aide d'un bistouri afin d'atteindre l'os crânien. A l'aide d'une fraise multi-lames carbure de tungstène bague verte montée sur un contre-angle relié à un moteur dentaire (Satelec, Merignac, France), un forage d'environ 1,2 mm de diamètre a été effectué au niveau de la calvaria de l'animal. L'implant a été placé au niveau de ce forage puis la peau a été suturée et désinfectée de la même façon que pour les implantations en sous-cutanés. Les échantillons ont été récupérés après une période d'implantation de 14 jours.



**Figure 20 : Implantation en calvaria des réassociations dentaires.**

*(A) zone d'implantation ; (B) implant après 2 semaines.*

## **VII. Histologie :**

Pour les coupes histologiques, les échantillons ont d'abord été fixés au Bouin-Hollande à température ambiante pendant 1 à 3 jours selon leur taille. La composition de cette solution de fixation est la suivante : 25 g/L d'acétate neutre de cuivre, 40 g/L d'acide picrique, 3,7% de formol et 1,5% d'acide acétique dilués dans de l'eau distillée. Les échantillons nécessitant une déminéralisation ont été déminéralisés pendant 2 semaines à 4°C dans 15% d'EDTA (Euromedex, Mundolsheim, France). Les échantillons ont ensuite été déshydratés avant leur inclusion dans la paraffine (la paraffine étant hydrophobe). La déshydratation a été réalisée par une succession croissante de bains d'alcool : 70% pendant 1 h, 90% pendant 1 h et trois bains successifs de 30 min à 100%. L'inclusion dans la paraffine a été effectuée dans une étuve à 60°C. Cette inclusion a pour but de faire pénétrer la paraffine à l'intérieur des échantillons fixés et également d'obtenir un bloc avec une masse homogène afin faciliter la coupe des échantillons. Les coupes ont été réalisées en série de 5 ou 7  $\mu\text{m}$  à l'aide d'un microtome. Avant la coloration, les coupes ont été déparaffinées par deux bains successifs de 5 min dans le LMR-SOL (Labo-Moderne, Paris, France). Elles ont ensuite été réhydratées progressivement par deux bains de 5 min à 100% d'alcool, un bain de 5 min à 95% d'alcool, un bain de 5 min à 70% d'alcool, un bain de 5 min à l'eau courante et un bain de 1 min à l'eau

distillée. Pour la coloration, les lames ont été incubées dans différents bains : 1 h dans une solution aqueuse saturée à 6% de chlorure mercurique, rinçage de 30 s à l'eau courante, 5 min dans le Lugol, rinçage de 30 s à l'eau distillée, 5 min dans une solution de thiosulfate de sodium 5%, rinçage de 5 min à l'eau courante, rinçage de 30 s à l'eau distillée, 5 min dans du permanganate de potassium à 0,25%, rinçage de 30 s à l'eau courante et à l'eau distillée, 5 min dans l'acide oxalique à 5% et rincées pendant 2 à 5 min dans l'eau courante puis dans l'eau distillée. La coloration a été réalisée pendant 24 h à température ambiante dans le colorant de Mallory dont la composition est la suivante : 0,1% d'hématoxyline, 2% d'acide phosphotungstique dilués dans de l'eau distillée. Après une nouvelle étape de déshydratation dans deux bains successifs de 5 min à 100% d'alcool et deux bains successifs de 5 min dans le LMR-SOL (Labo-Moderne, Paris, France), les lames ont été montées à l'histolaque-LMR® (Labo-Moderne, Paris, France) afin d'être observées.

## **VIII. Immunofluorescence indirecte :**

Les têtes embryonnaires et les têtes post-natales inférieures à 7 jours (< PN7) ont été fixées pendant 6 h à 4°C dans 4% de paraformaldéhyde dilué dans du PBS puis incubées dans des bains successifs de sucrose : 5% de sucrose dilué dans du PBS pendant une nuit à 4°C et 20% de sucrose dilué dans du PBS pendant 6 h à 4°C. Elles ont ensuite été placées dans des moules contenant du Tissue-Tek® OCT (Agar Scientific, Saclay, France) et congelées à -20°C pendant 24 h puis stockées à -80°C. Les têtes post-natales au-delà de 7 jours (> PN7) ont été fixées pendant 3 jours à 4°C dans 4% de paraformaldéhyde dilué dans du PBS puis déminéralisées pendant 2 semaines à 4°C dans 15% d'EDTA (Euromedex, Mundolsheim, France). Elles ont ensuite été placées dans des moules contenant du Tissue-Tek® OCT (Agar Scientific, Saclay, France) et congelées à -20°C pendant 24 h puis stockées à -80°C.

Les échantillons issus de culture *in vitro* (molaires intactes ou réassociations) ainsi que les explants (issus de l'implantation *in vivo*), ont directement été inclus dans le Tissue-Tek® OCT (Agar Scientific, Saclay, France) et congelés à -20°C pendant 24 h puis stockés à -80°C.

Afin de réaliser l'immunofluorescence indirecte, tous les échantillons congelés ont été débités, au cryostat (Leica, CM 3000), de manière sériée en coupes de 10 µm d'épaisseur. Les

coupes ont été récupérées sur des lames dont la surface est traitée à la polylysine et stockées à -20°C.

L'immunofluorescence indirecte a été réalisé de la manière suivante : les coupes (sorties de la congélation) ont été séchées puis rincées au PBS à température ambiante. Elles ont ensuite été fixées pendant 10 min à 4°C dans 4% de paraformaldéhyde dilué dans du PBS puis rincées trois fois pendant 5 min à température ambiante avec du PBS. Pour les antigènes nécessitant un démasquage, les coupes ont été incubées dans un bain de tampon citrate (10 mM d'acide citrique anhydre, 0,05% de Tween 20, pH 6,0) pendant 30 min à 80°C. Tous les échantillons ont ensuite été saturés avec 1% de BSA diluée dans du PBS pendant 30 min à température ambiante. Les anticorps primaires spécifiques, dilués dans du PBS (**Tableau 1**), ont été incubés pendant une nuit à 4°C. Après trois rinçages successifs de 5 min au PBS à température ambiante, les coupes ont été incubées avec les anticorps secondaires (dilués dans du PBS) correspondants couplés à l'Alexafluor 488 ou 594 (Invitrogen, Villebon sur Yvette, France) pendant 1 h à température ambiante et à l'obscurité. Après trois rinçages successifs de 5 min au PBS à température ambiante, les coupes ont été incubées dans du DAPI pendant 5 min à température ambiante puis à nouveau rincées trois fois pendant 5 min au PBS avant d'être montées entre lame et lamelle dans du milieu de montage pour fluorescence (Dako, Trappes, France) afin d'être observées.

| Anticorps                           | Type              | Fournisseur   | Perméabilisation | Saturation | Dilution |
|-------------------------------------|-------------------|---------------|------------------|------------|----------|
| <b>Anti-CD31</b>                    | Monoclonal Rat    | BD Pharmingen | Non              | BSA 1%     | 1/100    |
| <b>Anti-CD34</b>                    | Monoclonal Rat    | Ozyme         | Non              | BSA 1%     | 1/100    |
| <b>Anti-CD146</b>                   | Monoclonal Rat    | Ozyme         | Non              | BSA 1%     | 1/100    |
| <b>Anti-Coll IV</b>                 | Polyclonal Lapin  | Abcam         | Non              | BSA 1%     | 1/300    |
| <b>Anti-<math>\alpha</math>-SMA</b> | Polyclonal Lapin  | Abcam         | Non              | BSA 1%     | 1/100    |
| <b>Anti-E-cadhérine</b>             | Monoclonal Rat    | Tebu-bio      | Tampon citrate   | BSA 1%     | 1/200    |
| <b>Anti-Tau</b>                     | Polyclonal Lapin  | Abcam         | Tampon citrate   | BSA 1%     | 1/200    |
| <b>Anti-Nestine</b>                 | Polyclonal Chèvre | Tebu-bio      | Tampon citrate   | BSA 1%     | 1/100    |
| <b>Anti-Vimentine</b>               | Monoclonal Lapin  | Abcam         | Tampon citrate   | BSA 1%     | 1/500    |
| <b>Anti-NF200</b>                   | Polyclonal Lapin  | Sigma-Aldrich | Non              | BSA 1%     | 1/400    |
| <b>Anti-Péripérine</b>              | Polyclonal Lapin  | Abcam         | Non              | BSA 1%     | 1/600    |
| <b>Anti-GAP-43</b>                  | Monoclonal Lapin  | Abcam         | Tampon citrate   | BSA 1%     | 1/500    |
| <b>Anti-GFAP</b>                    | Polyclonal Chèvre | Abcam         | Tampon citrate   | BSA 1%     | 1/500    |
| <b>Anti-S100<math>\beta</math></b>  | Monoclonal Lapin  | Abcam         | Tampon citrate   | BSA 1%     | 1/300    |
| <b>GFP</b>                          | Polyclonal Chèvre | Abcam         | Tampon citrate   | BSA 1%     | 1/500    |

**Tableau 1 : Liste des anticorps utilisés.**

## **IX. Microscopie électronique à transmission :**

Pour la microscopie électronique à transmission (MET), les échantillons (réassociations implantées deux semaines, ganglion trigéminal et premières molaires inférieures issues de souris post-natales à différents stades) ont été fixés pendant une nuit à

4°C dans une solution de fixation composée de 2,5% de glutaraldéhyde (Sigma Aldrich, G5882) et 2,5% de paraformaldéhyde dilués dans un tampon cacodylate (0,1 M, pH 7,4). Après cette étape de fixation, les échantillons ont été rincés dans un bain de tampon cacodylate pendant 30 min puis déminéralisés pendant 2 semaines à 4°C dans 15% d'EDTA (Euromedex, Mundolsheim, France). Après déminéralisation, les échantillons ont été refixés pendant 1 h à 4°C dans 0,1% de tétroxyde d'osmium (Sigma Aldrich, 201030) dilué dans le tampon cacodylate puis déshydratés par une succession croissante de bains d'alcool avant leur inclusion : 50% pendant 30 min, 70% pendant 30 min, 90% pendant 30 min et trois bains successifs de 30 min à 100%. L'inclusion a été réalisée dans de la résine Epon 812. Les échantillons ont ensuite été débités en coupes semi-fines (2 µm) à l'aide d'un ultra-microtome (Leica Ultracut UCT), puis colorés dans du bleu de toluidine et observés au microscope photonique afin d'identifier dans l'échantillon les « zones d'intérêts ». Les « zones d'intérêts » choisies ont été recoupées en coupes ultra-fines (70 nm) et contrastées avec de l'acétate d'uranyle (pendant 7 min à l'obscurité) puis du citrate de plomb (pendant 7 min) afin d'être analysées à 70 kV au microscope électronique Morgagni 268 D (FEI). Les images ont été capturées à l'aide d'une caméra digitale Mega View III (FEI).



---

## **PARTIE 4**

## **RESULTATS**

---

## **Chapitre 1 :**

### **Ingénierie de l'organe dentaire : développement dentaire et innervation.**

Keller L-V, **Kökten T**, Kuchler-Bopp S, Lesot H (2014). Tooth organ engineering. In *"Stem Cell Biology and Tissue Engineering in Dental Sciences"*. (Vishwakarma A, Sharpe P, Shi S, Wang X-P, Ramalingam M, Eds), (In press : Accepted 03.03.2013).

## **Objectifs :**

Dans le cadre de la médecine régénérative, l'ingénierie tissulaire dentaire est un domaine de recherche à orientation clinique. C'est pourquoi cette science, à partir de cellules souches, a pour objectif la régénération de l'organe dentaire dans son intégralité. Notre équipe a développé une approche d'ingénierie basée sur la biomimétique et reposant sur l'utilisation de cellules dentaires embryonnaires. Contrairement à d'autres approches et notamment celles utilisant des biomatériaux (également appelés : « *scaffolds* »), notre stratégie permet le développement intégral de la dent. Pour cela, cette méthode requiert deux étapes successives : une première étape de culture *in vitro* de réassociations cellulaires dentaires, suivie d'une deuxième étape qui consiste à implanter *in vivo*, chez la souris adulte, les réassociations cultivées. La qualité du développement de la dent et l'organisation des matrices (pré-dentine, dentine, émail et ciment) sont des paramètres essentiels pour la fonctionnalité de l'organe dentaire régénéré. C'est pourquoi nous avons cherché à analyser ces paramètres dans notre modèle après chaque étape. Afin que les dents régénérées soient physiologiquement fonctionnelles, la vascularisation et l'innervation de celles-ci sont indispensables. Nous avons donc recherché dans le mésenchyme dentaire de nos réassociations implantées la présence de vaisseaux et de nerfs.

## **Méthodes :**

Pour cela, nous avons prélevé des germes de molaires issus d'embryons de souris au 14<sup>ème</sup> jour embryonnaire (JE14). Après une dissociation tissulaire puis cellulaire des germes dentaires, des réassociations cellulaires ont été réalisées sur un milieu de culture semi-solide. Les réassociations dentaires ont ainsi été cultivées pendant 8 jours avant d'être implantées durant deux ou trois semaines en sous-cutané chez les souris ICR adultes. Des implantations pendant deux semaines ont également été effectuées en calvaria et dans la mâchoire des souris ICR adultes, ou en sous-cutané chez les souris immunodéficientes (Nude). La morphogenèse coronaire, l'histogenèse épithéliale ainsi que la rhizogenèse ont été analysées en histologie. Cette technique nous a également permis de visualiser les cellules de la gaine épithéliale de Hertwig (GEH) impliquées dans la formation de la racine. De même, des ligaments péri-

dentaires reliant la dent à l'os néoformé dans le cas de nos implants ou à l'os alvéolaire pour les dents physiologiques ont été observés en histologie. Des comparaisons ont ainsi pu être réalisées entre nos implants et les dents physiologiques issues de souris PN4, PN9 et adultes. Des analyses en histologie et en immunofluorescence indirecte nous ont permis d'étudier la vascularisation et l'innervation des réassociations dentaires co-implantées avec un ganglion trigéminal (TG) en sous-cutané chez les souris ICR et Nude adultes. Pour cela, nous avons utilisé un anticorps dirigé contre le CD31 (ou PECAM-1) marquant les cellules endothéliales du réseau vasculaire et un anticorps dirigé contre la périphérine, marquant les fibres nerveuses. En effet la périphérine est une protéine des filaments intermédiaires présente dans toutes les fibres nerveuses du système nerveux périphérique. De plus, l'utilisation d'un anticorps dirigé contre la protéine Tau (*tubule-associated unit*) nous a permis d'identifier la nature des fibres nerveuses. Enfin, les résultats obtenus pour la vascularisation et l'innervation de nos réassociations implantées deux semaines ont été comparés à ceux d'une dent physiologique issue du stade PN4 du fait de leur similarité concernant le développement de la dent et la maturation des matrices.

## **Résultats et discussion :**

### **Morphogenèse coronaire, histogenèse épithéliale et différenciation cellulaire**

L'odontogenèse est basé sur des interactions continues et réciproques entre l'épithélium et le mésenchyme dentaire. Au cours du développement, le potentiel odontogène bascule du compartiment épithélial à celui du mésenchyme dentaire.

Après l'étape *in vitro*, le développement coronaire est initié. Les réassociations cellulaires présentent une histogenèse épithéliale complète, avec la formation d'un EDI, EDE, SR et d'un SI. A ce stade, la formation des cuspides ainsi que la différenciation fonctionnelle des odontoblastes sont initiées. En effet, les premiers odontoblastes fonctionnels et des pré-odontoblastes au contact de la lame basale, faisant face à des pré-améloblastes sont observés.

Après l'étape *in vivo*, les odontoblastes allongés et polarisés au contact de la jonction épithélio-mésenchymateuse (JEM) sont fonctionnels et sécrètent de la dentine. Au sein de la dentine, nous pouvons observer la présence de tubuli où les prolongements cytoplasmiques

des odontoblastes sont enchâssés. De même, les améloblastes se polarisent et deviennent fonctionnels pour sécréter de l'émail. Les coupes histologiques nous ont également permis de distinguer l'émail interne de l'émail externe. A ce stade, des vaisseaux sanguins sont observés en histologie, au sein de la pulpe dentaire, des odontoblastes, du mésenchyme péri-dentaire et au contact du SI. En plus d'assurer un rôle dans l'organogenèse, cette vascularisation permet la minéralisation de la dentine et de l'émail.

### **Rhizagenèse et parodonte**

L'implantation des réassociations cellulaires permet d'initier le développement des racines. En histologie et en immunofluorescence indirect, au niveau de l'apex des racines, nous pouvons observer la présence des cellules épithéliales de la GEH au contact des pré-odontoblastes racinaires. Ces cellules sont impliquées dans l'initiation de la rhizagenèse. Elles permettent également l'élongation de la racine, la stimulation de la cémentogenèse et la dentinogenèse racinaire. En histologie, nous pouvons également observer au niveau de la jonction racine/couronne, des cémentoblastes au contact de la dentine qui sécrètent du ciment. Afin que les deux matrices (dentine et ciment) présentent une bonne adhésion entre elles, la dentinogenèse racinaire et la cémentogenèse se déroulent de manière synchronisée. Dans le cas des réassociations cellulaires implantées (en sous-cutané, dans la mâchoire et en calvaria) des ligaments péri-dentaires se développent et interagissent avec le ciment et l'os néoformé. En effet, après implantation, cet os se forme à partir du mésenchyme péri-dentaire des réassociations cellulaires (Hu et al., 2006a; Honda et al., 2008; Nait Lechguer et al., 2011). Néanmoins en histologie, nous avons remarqué que l'interaction des ligaments avec le ciment est anticipée par rapport à l'os néoformé. Pour les dents physiologiques les ligaments péri-dentaires rejoignent l'os alvéolaire. En histologie, nous pouvons observer qu'au stade PN4, le mésenchyme péri-dentaire n'est pas encore organisé. A PN9, les ligaments péri-dentaires sont difficilement détectables. En revanche, ils sont nombreux et organisés chez l'adulte. En effet, la croissance des ligaments péri-dentaires est rapide entre les stades PN12 et PN16 (Lungová et al., 2011). Finalement, la cémentogenèse et le développement des ligaments péri-dentaires sont indispensables à l'ancrage de la dent. Une meilleure connaissance de ce compartiment dentaire permettrait donc de développer des stratégies efficaces pour le traitement des maladies parodontales.

## **Innervation**

L'ensemble des investigations précédentes montre qu'à partir de réassociations cellulaires nous obtenons, après implantation, le développement d'une dent dans son intégralité avec son système d'ancrage et son réseau vasculaire. Cependant, même si l'innervation ne semble pas indispensable à l'aboutissement du développement de nos réassociations dentaires, nous avons commencé à nous intéresser à la possibilité d'innover nos réassociations implantées. En effet, afin qu'une dent soit physiologiquement fonctionnelle, l'innervation de celle-ci est essentielle.

Les analyses histologiques nous montrent que le développement et la maturation des matrices des réassociations dentaires implantées en sous-cutané pendant deux semaines, sont similaires à une molaire issue du stade PN4. Les résultats obtenus en immunofluorescence indirecte, pour les dents physiologiques issues du stade PN4, nous montrent la présence de vaisseaux sanguins positifs à l'anticorps anti-CD31 et de fibres nerveuses positives à l'anticorps anti-périphérine au niveau du mésenchyme péri-dentaire et de la pulpe dentaire. Pour les réassociations cellulaires co-implantées en sous-cutané, avec un TG pendant deux semaines chez les souris ICR, nous avons observé la présence de fibres nerveuses au niveau du mésenchyme péri-dentaire. Cependant, malgré la présence de vaisseaux sanguins, aucune fibre nerveuse ne pénètre dans la pulpe dentaire. La situation reste inchangée malgré une durée d'implantation plus longue (trois semaines).

Lorsque ce protocole est réalisé chez des souris immunodéficientes (Nude), nous avons remarqué que les réassociations dentaires implantées deux semaines sont également similaires à une dent physiologique issue du stade PN4. En revanche, chez ce modèle animal, nous pouvons observer, en immunofluorescence indirecte, la présence de fibres nerveuses aussi bien au niveau du mésenchyme péri-dentaire que de la pulpe dentaire. De plus l'utilisation d'un anticorps dirigé contre la protéine Tau, nous montre que ce sont des axones qui innervent la pulpe des dents physiologiques et de nos réassociations dentaires.

Par ces observations, nous avons montré que notre approche d'ingénierie de l'organe dentaire permettait d'obtenir une dent multicuspidée à partir de réassociations de cellules embryonnaires dentaires, cultivées et implantées. L'organe régénéré présente une morphogénèse coronaire correcte avec la formation des racines et du parodonte. Notre

stratégie expérimentale permet la différenciation des odontoblastes, améloblastes et cémentoblastes. Ces cellules sont capables de sécréter, respectivement, la pré-dentine, la dentine, l'émail et le ciment. Nous avons également montré que la vascularisation des dents obtenues est possible après implantation tandis que l'innervation de celles-ci n'est envisageable que dans certaines conditions. Il est alors nécessaire d'étudier d'une manière plus approfondie l'innervation de nos réassociations dentaires implantées afin d'identifier les mécanismes impliqués.



Chapter 28

Tooth Organ Engineering

Letitia V. Keller,<sup>1,2</sup> Tunay Kökten,<sup>1,2</sup> Sabine Kuchler-Bopp,<sup>1,2</sup> and Hervé Lesot<sup>1,2</sup>  
<sup>1</sup>INSERM UMR1109, team “Osteoarticular and Dental Regenerative NanoMedicine,” Faculté de Médecine, Université de Strasbourg, Strasbourg, France  
<sup>2</sup>Université de Strasbourg, Faculté de Chirurgie Dentaire, Strasbourg, France

Chapter Contents

|                                                                               |   |                                               |   |
|-------------------------------------------------------------------------------|---|-----------------------------------------------|---|
| 28.1 Introduction                                                             | 1 | 28.3 Tooth Engineering Using Non-Dental Cells | 7 |
| 28.2 Tooth Organ Engineering Using Dental Embryonic Cells                     | 1 | 28.3.1 Mesenchymal Cells                      | 7 |
| 28.2.1 Crown Morphogenesis, Epithelial Histogenesis, and Cell Differentiation | 1 | 28.3.2 Epithelial Cells                       | 7 |
| 28.2.2 Root, Periodontium, and Bone Formation                                 | 3 | 28.4 Human Dental Stem Cells                  | 8 |
| 28.2.2.1 Root Formation                                                       | 3 | 28.5 Conclusion                               | 8 |
| 28.2.2.2 Periodontium Attachment to Bone                                      | 4 | Acknowledgments                               | 8 |
| 28.2.3 Innervation                                                            | 5 | Abbreviations                                 | 8 |
| 28.2.4 Fate of Engineered Teeth after Long-Term Implantation                  | 7 | References                                    | 8 |

28.1 INTRODUCTION

As part of regenerative medicine, tooth organ engineering is a clinically oriented area of research [1–4]. However, the more this field is being explored, the more distinct biological challenges will need to be solved before any clinical development can be considered [5]. Some of these questions can be addressed individually. For example, the maintenance of odontogenetic properties of cells *in vitro*, as a prerequisite for cell expansion, is a problem in itself [6,7]. It can be approached very empirically. However, some other questions are much more integrated ones and are interconnected with different complementary aspects. For example, the choice of cell sources is determined by the stage at which one wants to start tooth engineering. Indeed, during odontogenesis, the inductive potential shifts from the epithelium to the mesenchyme, and this is a critical parameter for the choice of cells to be used when trying to develop a biomimetic approach of organ engineering [8]. Similarly, reproducing the complexity of tooth attachment to alveolar bone will require taking into account the differentiation of several cell types, maintaining a good balance between them, and the synchronization of very distinct biological processes [9–11].

Summarizing the main achievements concerning the goal of engineering a complete tooth and attachment tissues, attempts will be made to point out the main questions that still need to be addressed. Three complementary areas will be considered sequentially: (1) the results one could obtain using dental embryonic cells and the questions which arose from this initially well-defined system; (2) the attempts now made to use non-dental cells as substitute sources for either the epithelial or mesenchymal compartment, necessarily keeping one dental constituent for the reassociation; and (3) the parallel studies of dental stem cells, which mostly aim to characterize and understand their properties, although nothing is known about their potential usefulness for organ engineering.

28.2 TOOTH ORGAN ENGINEERING USING DENTAL EMBRYONIC CELLS

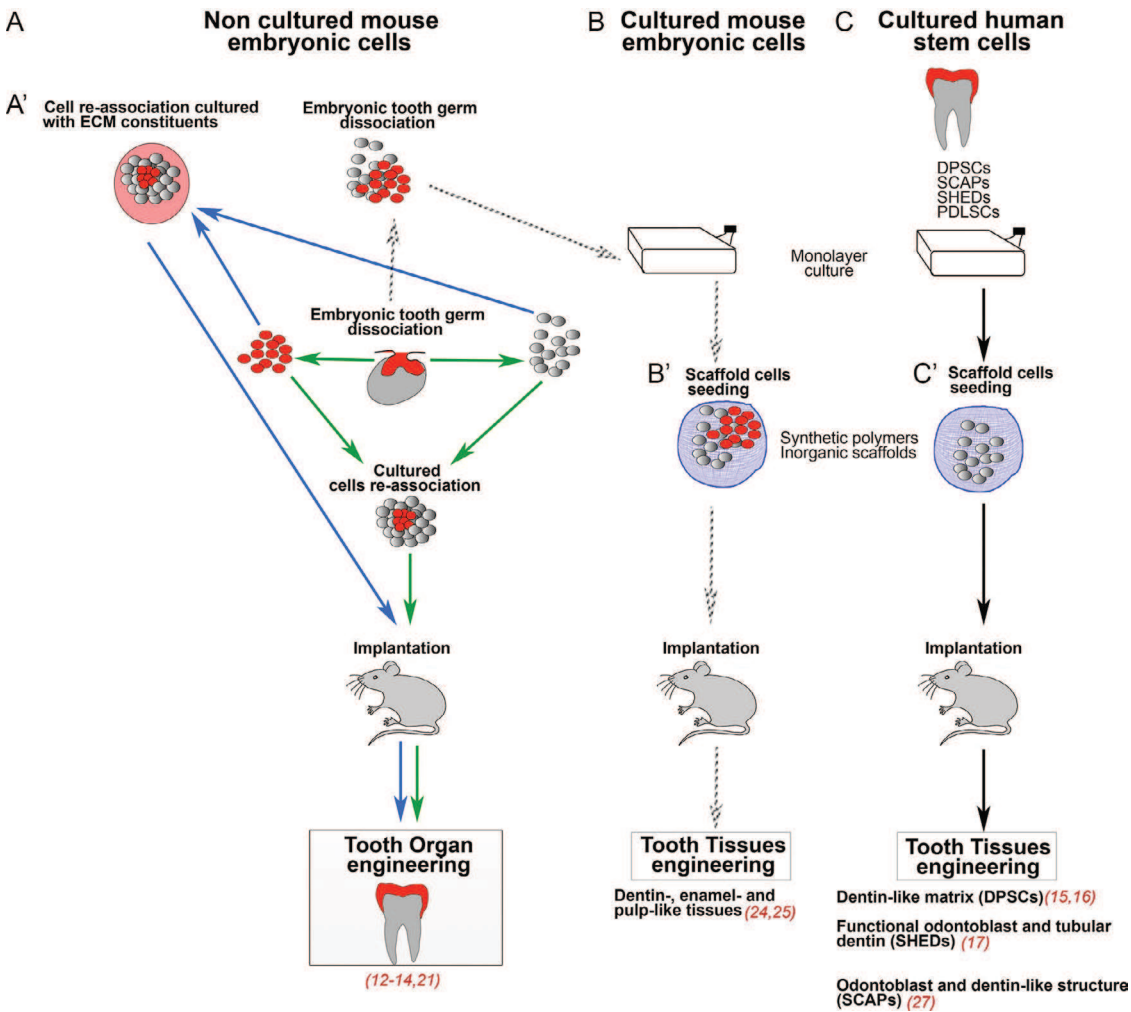
28.2.1 Crown Morphogenesis, Epithelial Histogenesis, and Cell Differentiation

The most detailed studies concerning the design of methods for the engineering of a complete tooth have been performed using mouse cells from embryonic tooth germs [12–14].

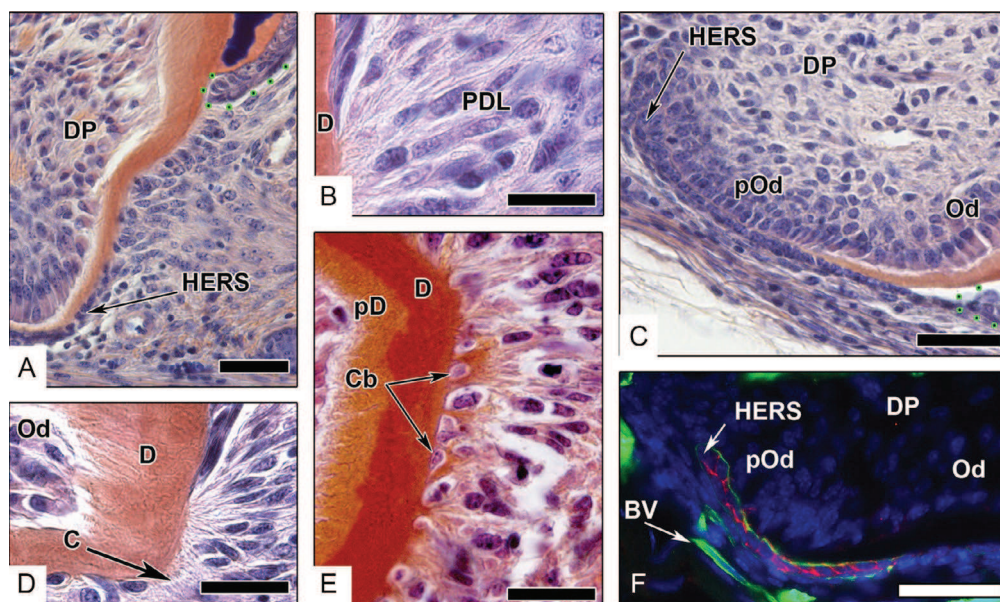
The reason is that a large amount of data exists concerning tooth development, since the mouse model had for a long time been recognized as a very convenient one to study epithelial–mesenchymal interactions. Most past studies dealt with very few mouse strains, to allow better comparison between results from different laboratories and reproducibility, which could hardly be achieved using human cells [15–18]. Finally, the time generation and duration of odontogenesis in the mouse are quick enough to allow regular experiments to be performed within a reasonable period of time.

p0210     Engineering a whole tooth using embryonic dental cells from the cap stage (ED14) has been reproducibly achieved in several laboratories, using closely related methods (for review, see [19] and citations therein). Very good results have also been obtained using mesenchyme from the bud stage [20]. When comparing cells from the cap and bud

stages, the initial stages of tooth re-formation appeared to proceed faster with mesenchymal cells from the bud stage [13]. This is probably because the cells were already at the right stage, and could immediately engage in the formation of a new dental bud. The use of dental embryonic cells allowed the methodology to be set up to attain the formation of the whole organ (Figure 28.1A). This generally required a two-step method where reassociated single epithelial and mesenchymal cells were first cultured for a time before they were implanted [21,22]. During the first step *in vitro*, crown development was initiated. The mesenchymal cells could specify both the inner and outer dental epithelium. Within 8 days *in vitro*, a complete epithelial histogenesis was achieved, cusp morphogenesis was initiated, and the functional differentiation of odontoblasts had started. After implantation of the cultured cell reassociations under the



f0010     **FIGURE 28.1** Protocols for tooth organ engineering using dental cells. Whole tooth organ can be engineered after culture and implantation of mouse embryonic single dental cell re-associations (A). Embryonic dental single cells have also been injected in extracellular matrix constituents before their implantation to engineer a whole tooth organ (A'). (B) If mouse or rat embryonic dental single cells were cultured before being seeded in inorganic scaffold or in synthetic polymer (B'), only dental tissues could be regenerated. (C) Cultured human dental cells, such as DPSCs, SCAPs, SHEDs or PDLSCs, seeded on scaffolds (C') led to tooth tissues regeneration after implantation.



**FIGURE 28.2** Root formation during implantation of dental embryonic (ED14) cell re-associations. Root formation could be initiated after subcutaneous implantation for two weeks of cultured cells re-associations (A). Periodontium formed including periodontal ligament fibers (B), which interacted with the cementum (D) secreted by cementoblasts (E). After two weeks of implantation, root pre-odontoblasts were in contact with HERS cells (C). In the most apical part of the root, a basement membrane, visualized after staining for collagen type IV (in green), was interposed between HERS cells, positive for E-cadherin (in red), and pre-odontoblasts (F). Cb: cementoblasts; C: cementum; D: dentin; DP: dental pulp; Od: odontoblasts; pD: predentin; PDL: periodontal ligament fibers; pOd: preodontoblasts. Scale bars=20 μm (B, D, E); 40 μm (A, C, F).

skin of adult mice, the implants became vascularized, ameloblasts became functional and dentin, as well as enamel, was mineralized [23]. Implantation also allowed the initiation of root formation (Figure 28.2).

For tooth organ engineering, scaffolds (Figure 28.1B) have quickly been omitted, as they appeared useless, and also because of the possible risk of interfering with the epithelial–mesenchymal junction, or possibly disturbing the gradients of odontoblast and ameloblast differentiation [24,25]; for review see [19]. Compared to initial attempts, the techniques to engineer teeth have thus been considerably simplified. The main difficulties now appear to lie in finding competent cells to be used, taking into account the specifics of tooth development [8,19]. Indeed, odontogenesis results from continuous and reciprocal interactions between an epithelium and an ectomesenchyme, and the inductive potential shifts from the epithelium to the ectomesenchyme. Thus trying to mimic this process at the molecular level still remains impossible when dealing with the currently available cells. For example, it is now possible to rapidly detect whether reassociations will fail to give rise to a tooth. Indeed, preceding failure, different mesenchymal cell types showed local disruptions in the epithelial–mesenchymal junction [26]. However, we do not yet know required molecular markers, which would allow us to obtain this information still earlier. For that reason, it appears necessary to identify the simplest minimum requirements that need to be preserved: still a fully open area of research. A lot remains

to be investigated by using dental embryonic cells in order to be able to move to a functional cell source: competent non-dental cells still present in the adult. However, the ability of dental mesenchymal cells to engage in tooth formation rapidly decreased from ED14 to ED16, and was lost at ED18 in the mouse first lower molar [26]. It is not yet clear whether this results from a decrease in the odontogenic potential of mesenchymal cells, from a change in the mesenchymal cell heterogeneity when odontogenesis progresses, or from the progressive inability of mesenchymal cells to adjust to an ED14 dental epithelium when stage difference increases between the two tissues [7]. Such questions will have to be specifically addressed when trying to select stem cells from different origins, or to better understand the differences they may show when experimentally tested in different types of epithelial–mesenchymal interactions.

Since achieving a correct crown shape and size still remains a major challenge, it has been proposed that efforts should be mainly centered on engineering a functional anchoring system (root/periodontal fibers/bone) on which an artificial crown might then be adjusted [8,27].

## 28.2.2 Root, Periodontium, and Bone Formation

### 28.2.2.1 Root Formation

Key cells in root formation are Hertwig's epithelial root sheath (HERS) cells. They appear to be involved in the



initiation of the process, in root elongation, and in stimulating both cementogenesis and root dentinogenesis [28]. Tooth organ engineering thus requires the differentiation and maintenance of active HERS cells (Figure 28.2A,C,F). By remaining at the root apex, HERS cells are in contact with root preodontoblasts (Figure 28.2C,F) and allow the progressive elongation of the root in implanted cell reassociations [23]. In between HERS cells and the root–crown junction, peridental mesenchymal cells are in contact with root dentin (Figure 28.2A–E). In this area, cementoblasts differentiate and become functional after cultured cell reassociations have been implanted (Figure 28.2D) [23]. Still, the mechanism involved in the guidance of root development by HERS cells is not clear [29,30]. TGFβ/BMP signaling has been suggested to play a crucial role. In particular, Smad4 expressed by HERS cells was reported to stimulate the expression of Nfic (Nuclear factor 1c) in dental mesenchymal cells, and therefore to be involved in the signaling for root formation and elongation [31]. In this context, observations made mostly using the incisor showed that Nfic is also involved in root dentin deposition [32,33]. Besides this role in root dentinogenesis, HERS cells are also involved in cementogenesis [18,34]. Although HERS cells appear only after the implantation of cultured cell reassociations, long-term implantations have not been performed to determine the fate of these cells and see whether they proceed as in a physiological situation.

p0230 During root formation, it is important to be able to reproduce the physiological cell heterogeneity in the peridental mesenchyme, including its vascularization and innervation [35,36]. The origin of cementoblasts is still under debate [34,37]. However, trying to reproduce the complexity of full periodontium differentiation presupposes the different cell populations taking part to progressively appear during tooth organ engineering, as it does physiologically. For this purpose, designing a system where the early stages of odontogenesis may proceed greatly facilitates the whole process, since the peridental mesenchyme is progressively specified during development [7]. This was possible using dental embryonic cells, but still remains as a major challenge when trying to move to dental or non-dental stem cells. Experiments performed by co-culturing rat dental follicle cells (DFCs) and dental pulp cells (DPCs) on both sides of a polycarbonate membrane (0.4 μm pore size) showed that DPCs could influence the differentiation of DFCs to produce periodontal components [38]. These authors showed that DFCs alone only formed fibrous tissues. However, once committed to osteogenesis, they could maintain this specific phenotype, and fibrous cells were connected to the newly formed bone-like tissue. Since the interposed polycarbonate membrane impaired direct contacts between the two cell populations, it was suggested that the differentiation of DFCs was induced by soluble factors produced by DFCs [38]. Similar mechanistic questions have been addressed to test the role of HERS cells in the differentiation of DFCs.

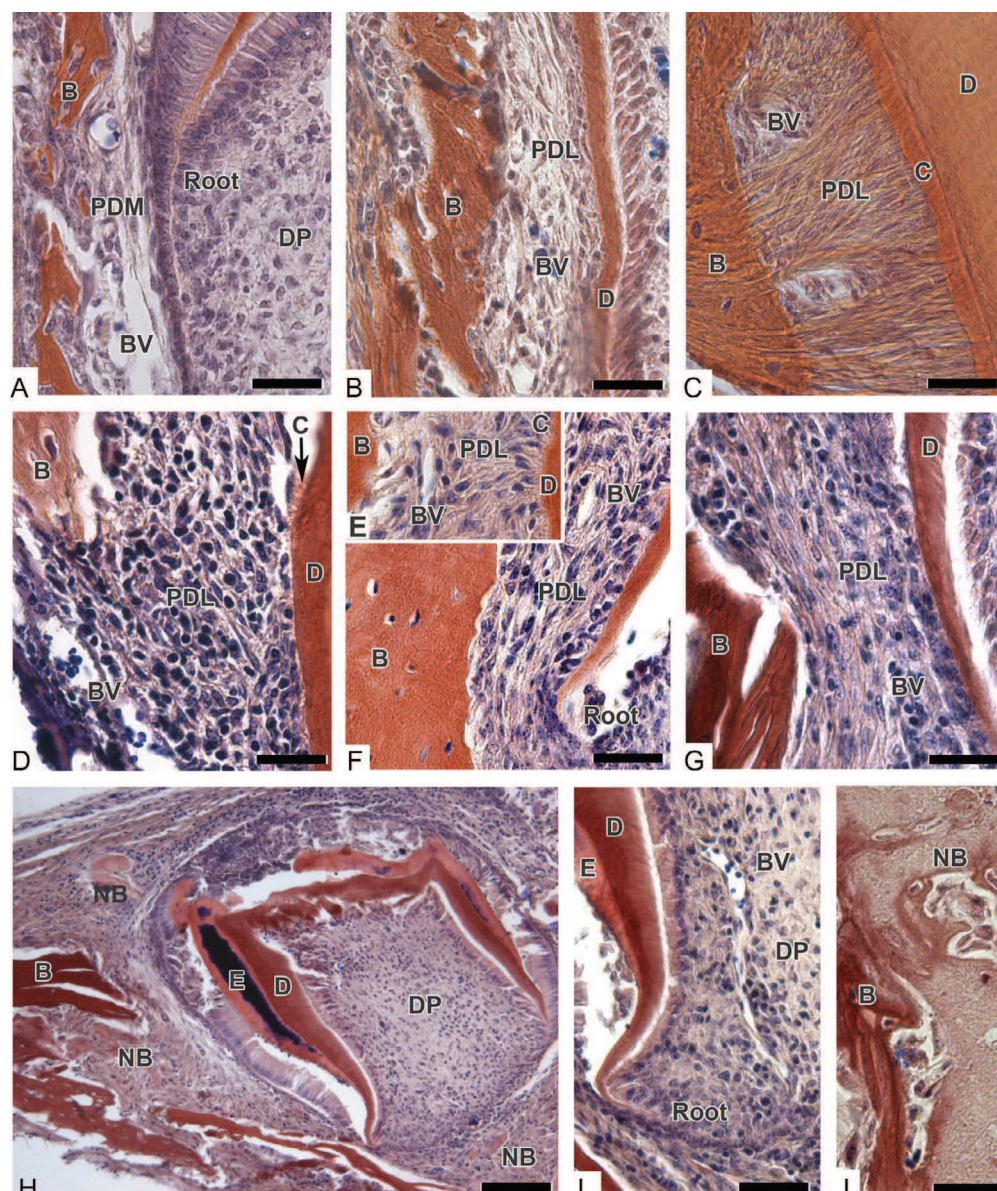
Co-culture experiments with the two cell types confirmed that HERS cells were important to induce the secretion of a cementum-like matrix and the formation of periodontal ligament-like tissues [39].

#### 28.2.2.2 Periodontium Attachment to Bone

Tooth attachment first requires the deposition of cementum, together with good adhesion of this matrix to root dentin, which means a synchronized production of the two distinct matrices [9,40]. All this could be achieved after implantation of cultured dental embryonic cell reassociations (Figure 28.2B–D), since the physiological epithelial–mesenchymal interactions could proceed beyond crown formation *in vitro* [21]. Tooth attachment is mediated by periodontal ligament (PDL) fibers (Figure 28.3C), which interact and bind with both the cementum and the alveolar bone (Figure 28.3C) [41]. The restoration of these interactions is precisely the point where current strategies to treat periodontitis fail [11]. Bone can form from the peridental mesenchyme when this becomes specified after the implantation of cultured cell reassociations [21,23,42,43]. However, it remains a slow process. A coordinated expression of BMPs/osteogenic protein (OPs) family members has been proposed to be responsible for the induction and regulation of cementogenesis, as well as periodontal ligament and alveolar bone formation (for review see [36]).

After implantation of cell reassociations under the skin of adult mice, PDL fibers develop, interact with the cementum, and extend towards newly-formed bone (Figure 28.3D [21]). PDL fibers interact earlier with the cementum (Figure 28.2B,D) than with the newly-formed bone. During postnatal development, the embedding of PDL fibers into bone is a late process; well visible in the adult (Figure 28.3C), it is hardly detected at PN9 (Figure 28.3B). At PN4, the peridental mesenchyme did not show any characteristic organization (Figure 28.3A). The rapid growth of the PDL was reported to take place in between PN12 and PN16 [10].

Implantations have also been performed in the jaw of adult mice (Figure 28.3E,F [22,44,45]). After two weeks, implanted cell reassociations showed the interaction of PDL fibers with the bone surrounding the tooth (Figure 28.3E), although still in limited areas (Figure 28.3F). However, such implantations can be performed more easily in the calvaria (Figure 28.3G–J), a desmogenic bone as is the alveolar bone. Calvaria may thus be used as a model site of implantation to further investigate bone reformation (Figure 28.3H,J), its fusion with the pre-existing one during healing, and tooth attachment versus ankylosis. Investigating these points will require long-term implantations [42,43,46]. Several complementary aspects remain to be evaluated, including the possibility of reproducing alveolar bone formation in a homogeneous way all around the tooth, and not only in limited areas [41].



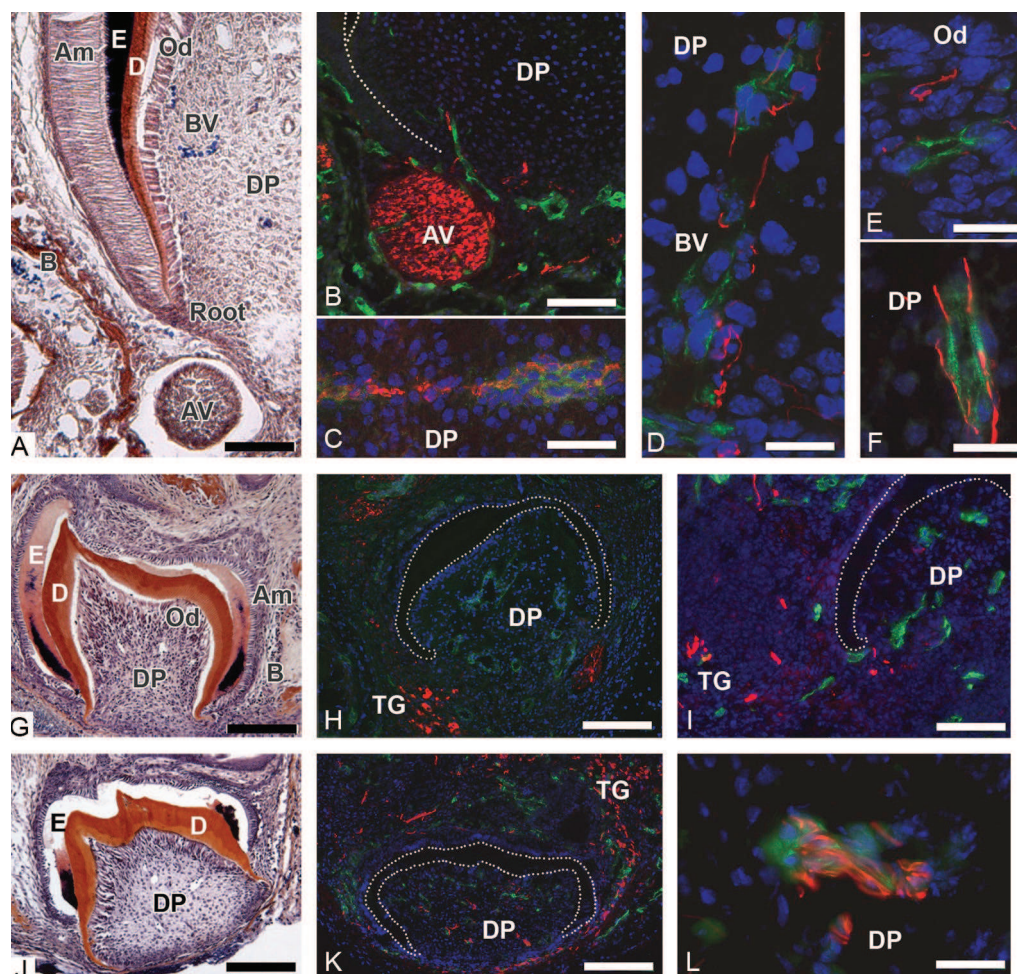
**FIGURE 28.3** Histological sections of mouse first lower molars at PN4 (A), PN9 (B), and adult (C), and of ED14 re-associations cultured for 8 days and implanted for 2 weeks under skin (D), in jaw (E, F), and in calvaria (G–J) of adult mice. B: bone; BV: blood vessel; C: cementum; D: dentin; DP: dental pulp; E: enamel; NB: new bone; PDL: peridental ligament; PDM: peridental mesenchyme. Scale bars = 90  $\mu$ m in A, 40  $\mu$ m in I, and 20  $\mu$ m in B–H, J.

### 28.2.3 Innervation

Nerves in the dental and peridental tissues mediate dentinal sensitivity, allow the regulation of masticatory forces, and indirectly affect tissue homeostasis, blood flow, and tissue healing [47–49]. Innervation of the first lower molar takes place postnatally in the mouse (Figure 28.4A–F). Tooth innervation and the molecular mechanisms which sustain it during odontogenesis have been investigated in detail [50–52]. However, the innervation of engineered tooth still remains a main challenge (43,6 and references therein). When cell reassociations were implanted under the skin of adult ICR mice, there was no innervation of the dental or

peridental mesenchymes after two weeks, although the two tissues were vascularized [19,6]. When cultured reassociations were implanted together with trigeminal ganglia, the dental mesenchyme did not become innervated after two, or even three, weeks (Figure 28.4H–I). However, when cell reassociations were implanted together with trigeminal ganglia in immunocompromised Nude mice (Figure 28.4J) instead of ICR, the innervation of the dental mesenchyme was made possible after two weeks (Figure 28.4K–L). Immunostaining for Tau protein, a marker of axons [53], indicated that in implanted reassociations (Figure 28.4L), as in the first lower mouse molar at PN4 (Figure 28.4C), axons





**FIGURE 28.4** Innervation of a mouse first lower molar at PN4 (A–F) and attempts to innervate re-associations implanted in ICR (G–I) and nude mice (J–L). Histological section of a PN4 first lower molar showing the alveolar nerve next to the apical part of the root (A). Blood vessels were stained by an anti-CD31 antibody (green) and axons by an anti-peripherin antibody (red) (B,D–F). Double staining showed that axons in the dental pulp were positive for peripherin (red) and Tau (green) antibodies (C). Axons in the dental pulp followed the blood vessels (B,D,F) and reached the odontoblast layer (E). Histological section of cell re-association implanted for two weeks under skin in ICR mice (G). Double stainings for CD31 (green) and peripherin (red) were performed on re-associations implanted for two weeks (H) and 3 weeks (I) in the presence of trigeminal ganglia from newborn mice. Axons from the trigeminal ganglia never entered the dental pulp (H,I). Histological section of cell re-association implanted for two weeks under skin in Nude mice (J). Double stainings for either CD31 (green) and peripherin (red) (K) or Tau (green) and peripherin (red) (L) in re-associations co-implanted for two weeks with trigeminal ganglia. In this case, axons entered the dental pulp (K, L). Double staining showed a co-localization of peripherin and Tau (L). Am: ameloblasts; AV: alveolar nerve; B: bone; BV: blood vessel; D: dentin; DP: dental pulp; E: enamel; Od: odontoblast; TG: trigeminal ganglia. Bars = 90 μm in A,B,G–K, and 20 μm in C–F,L.

were present in the dental mesenchyme. Immunostaining for MAP2, which is specific for dendrites [53], remained negative (data not shown). Although still far from the physiological situation in the jaw, co-implantation experiments of cultured cell reassociations with trigeminal ganglia are necessary to better understand the possible cellular and molecular limiting parameters. Further experiments are in progress to investigate the role of immunological mechanisms in impairing the innervation of the dental mesenchyme.

While during development the innervation of the dental mesenchyme is known to originate from the alveolar nerve, it has been reported that DPSCs can differentiate into

neurons and also can induce axon guidance [54,55]. Since this potential has mainly been investigated in non-dental systems, it will be important to determine whether such a situation may exist as well in the pulp itself during reparative processes.

The main question concerning innervation is to determine whether an engineered tooth, when implanted in the jaw, might be innervated by axons originating from the alveolar nerve. One experimental approach has been performed by implantation in the kidney and further transplantation in the jaw [43]. These authors suggested that after transplantation in the jaw, quite old or mature engineered

teeth can be innervated as well, which was surprising given the amount of bone surrounding the implant, including in the root apex area (see Figures 1C and E in reference [43]).

#### s0045 28.2.4 Fate of Engineered Teeth after Long-Term Implantation

p0265 The fate of long-term implantations will have to be investigated in detail to ensure the maintenance of implanted reassociations, to obtain a correct healing process so that the newly-formed bone which develops from the peridental mesenchyme can fuse with the alveolar bone, and also to ensure that ankylosis will not happen at late stages [43]. Similarly, the maintenance of a pulp chamber with the correct size has not yet been investigated. Using dental cells from porcine tooth germs at the age of six months, Honda et al. [42] have shown that implantations for 20 weeks allowed the maintenance of healthy implants.

### s0050 28.3 TOOTH ENGINEERING USING NON-DENTAL CELLS

p0270 Odontogenesis is mediated by reciprocal epithelial–mesenchymal interactions, and the instructive potential shifts from the epithelium to the ectomesenchyme at ED12–12.5 in the mouse embryo [56]. As long as the instructive potential of a dental tissue is maintained, attempts can be made to replace the responding one by competent cells. Such a strategy has been tested with cells from different sources, but mainly as attempts to replace the epithelial compartment. Much less has been done trying to use non-dental cells to replace the mesenchyme.

#### s0055 28.3.1 Mesenchymal Cells

p0275 Attempts to use non-dental mesenchymal cells for organ engineering are facing a specific difficulty with the isolation of the epithelium. Still, only one experimental approach has been designed using non-dental mesenchymal cells and a very young oral epithelium to engineer a complete tooth [57]. It is indeed extremely difficult to isolate an odontogenic epithelium from very early stage embryos, and the amount of tissue remains very limited.

p0280 To try to replace the mesenchymal compartment, bone marrow-derived cells (BMDC) have been recombined with an oral epithelium from ED10 mouse embryo when it is still able to instruct the mesenchymal compartment. In these conditions, the BMDC were shown to respond to the epithelial signaling and to end up with tooth formation after implantation of the reassociation [57]. In about 10% cases, it was possible to obtain teeth after implantation of the reassociations in the kidney capsule [57]. At that stage, the specification of the mesenchymal cells should not be critical, as long as they retain a certain degree of plasticity

to respond to the signaling from the epithelium. However, having no way to recognize the correct side of the epithelium, initially in contact with the mesenchyme, reassociations had to be performed in a random way. This might in part explain the low percentage of positive results with this approach. It might be worth testing the palatal epithelium at early stages, since it shares a common origin with the dental epithelium and would represent a larger number of cells [58,59]. Indeed, converse experiments showed that the palatal epithelium can give rise to ameloblasts [20]. It is still not known whether at an earlier stage, palatal epithelial cells could stimulate tooth formation when reassociated with non-dental mesenchymal cells.

More recently, attempts have been made to use neural crest-like cells (NCLCs) derived from mouse induced pluripotent stem (iPS) cells [60]. These cells were recombined with the apical end of an incisor dental epithelium and cultured for two weeks. Using molecular markers, these authors concluded that it is possible to induce NCLCs into odontoblast-like cell differentiation. Complementary results, although obtained with a more complex methodology (i.e., requiring iPS to be mixed with incisor mesenchymal cells), confirmed the above observations [61]. Still, further experiments will be necessary with these cells to show that it is possible to obtain gradients of polarized odontoblasts secreting predentin/dentin with the required mineral organization.

#### 28.3.2 Epithelial Cells

At a later stage, when the mesenchyme has become instructive, several different epithelial cell sources have been tested, such as cell lines derived from the oral epithelium from mouse embryos [62], palatal epithelial cells [20] and, more surprisingly, keratinocytes [63]. All these three cell types gave very promising results when tested in reassociations, by showing a complete epithelial histogenesis and the differentiation of secretory ameloblasts. The last two cell sources, still present after birth, should be of interest for further clinical applications, since they should be easily available. However, in these studies, the events occurring during the early stages of the reassociations have not been investigated (for review, see [6]). Furthermore, the odontogenic potential of palatal epithelial cells will have to be investigated in humans to determine whether it exists as in the mouse.

Under specific experimental conditions, BMDCs could adjust to their environment and behave as inner dental epithelial cells, to give rise to polarized functional ameloblasts [64]. However, these experiments still require the use of dental epithelial cells to bring cohesion and to stabilize the BMDCs in the reassociations. For this reason, GFP-labeled BMDCs were used in order distinguish them from the dental epithelial cells. These experiments provided important



information on the potential of bone marrow cells. However, a strategy for a potential clinical application would require: (1) that it is possible to stabilize BMCs using non-dental epithelial cells; and (2) that a population of inductive mesenchymal cells is available. Although the replacement of dental epithelial cells might be solved rather easily, the existence of inductive dental ectomesenchymal cells in the adult would be much more difficult to find, since cell aging appears to be a major problem [26].

28.4 HUMAN DENTAL STEM CELLS

Two main axes are developed with human dental stem cells: (1) isolating, identifying, and characterizing these cells from dental and peridental tissues; and (2) testing their capacities to engage in reparative processes and tissue regeneration, such as periodontium, cementum, and dentinogenesis (Figure 28.1C) [15,18,65].

Most of the studies with cells of human origin were performed using stem cells from either the dental mesenchyme (DPSC, SHED, SCAP) or the peridental mesenchyme, periodontal ligament stem cells (PDLSC). Pioneer work by Gronthos et al. [15,66] has shown that human dental pulp stem cells could be induced to form a dentin/pulp-like complex. Similarly, SHED cells have been used for tissue reparation and have been found to be able to repopulate a pulp chamber to form a pulp-like tissue [67]. PDLSCs can differentiate to produce cementoblast-like cells and cementum/periodontal ligament-like tissue [11,68]. However, it is not known whether these human stem cells could be used to engineer a whole tooth. Indeed, a very important limiting parameter for that purpose is the lack of epithelial cells that would be able to induce competent mesenchymal stem cells to engage in odontogenesis. In this specific perspective, we do not have a strategy to specify epithelial stem cells to behave as the early inductive cells which initiate odontogenesis [8].

28.5 CONCLUSION

After encouraging beginnings to define methodologies, to evaluate specific biological requirements, and to try to simplify the question, a lot remains to be done, still working with embryonic mouse dental cells to address more specific points. Indeed, the system is well-defined and allows easy comparison between different laboratories. Methodological adjustments will be necessary when changing cell sources. The main results will probably have to be revisited when trying to reproduce them with dental stem cells or non-dental cell sources. The next steps for tooth organ engineering will then have to deal with epithelial cells in the adult. Indeed, the main difficulty then is that we still do not know the molecular mechanisms sustaining the “instructive potential” of the epithelium, as required for the specification of

mesenchymal cells and the initiation of odontogenesis [56]. For this reason, the proposal to focus on root engineering still remains the best alternative, as long as it might be performed without having to engineer a crown first. Up to now, the mouse model allowed working with a constant genetic background, carefully selecting the age of tissues to work with competent cells, and having a fast progression in the different steps of odontogenesis. Such a simplified situation will no longer exist when considering clinical perspectives.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Hervé Gegout for the histology, and Ann Huyseune, Henry Magloire, Jean-Christophe Maurin, Renata Peterkova, Anne Poliard, and Henri Tenenbaum for helpful discussions. This work was supported by the INSERM, the Université de Strasbourg (Faculté de Chirurgie Dentaire), and a grant (M200451201) from the Academy of Sciences of the Czech Republic.

ABBREVIATIONS

|           |                                                 |
|-----------|-------------------------------------------------|
| BMC       | bone marrow cell                                |
| BMDC      | bone marrow-derived cell                        |
| BMP       | bone morphogenetic protein                      |
| DFC       | dental follicle cell                            |
| DPC       | dental pulp cell                                |
| DPSC      | dental pulp stem cell                           |
| ED        | embryonic day                                   |
| GFP       | green fluorescent protein                       |
| HERS      | Hertwig’s epithelial root sheath                |
| ICR mouse | institute for cancer research mouse             |
| iPS       | induced pluripotent stem cells                  |
| MAP2      | microtubule associated protein 2                |
| NCLC      | neural crest-like cell                          |
| Nfic      | nuclear factor I/C                              |
| OPs       | osteogenic proteins                             |
| PDL       | periodontal ligament                            |
| PDLSC     | periodontal ligament stem cell                  |
| PN        | postnatal                                       |
| SCAP      | stem cell from the apical papilla               |
| SHED      | stem cell from human exfoliated deciduous teeth |
| TAU       | tubule-associated unit                          |
| TGFβ      | transforming growth factor β                    |

REFERENCES

[1] Smith AJ. Tooth tissue engineering and regeneration – a translational vision! J Dent Res 2004;83(7):517.  
[2] Nakahara T, Ide Y. Tooth regeneration: implications for the use of bioengineered organs in first-wave organ replacement. Hum Cell 2007;20(3):63–70.

- [3] Ferreira CF, Magini RS, Sharpe PT. Biological tooth replacement and repair. *J Oral Rehabil* 2007;34(12):933–9.
- [4] Casagrande L, Cordeiro MM, Nör SA, Nör JE. Dental pulp stem cells in regenerative dentistry. *Odontology* 2011;99(1):1–7.
- [5] Yildirim S, Fu SY, Kim K, Zhou H, Lee CH, Li A, et al. Tooth regeneration: a revolution in stomatology and evolution in regenerative medicine. *Int J Oral Sci* 2011;3(3):107–16.
- [6] Keller L, Kuchler-Bopp S, Lesot H. Whole tooth engineering and cell sources. In: Huang GTJ, Thesleff I, editors. *Stem cells in craniofacial development and regeneration*. Hoboken, NJ: Wiley-Blackwell John Wiley & Sons Inc.; 2013. p. 431–46.
- [7] Keller LV, Kuchler-Bopp S, Lesot H. Restoring the physiological cell heterogeneity in the mesenchyme during tooth engineering. *Int J Dev Biol* 2012;56(9):737–46.
- [8] Volponi AA, Pang Y, Sharpe PT. Stem cell-based biological tooth repair and regeneration. *Trends Cell Biol* 2010;20(12):715–22.
- [9] Foster BL, Popowicz TE, Fong HK, Somerman MJ. Advances in defining regulators of cementum development and periodontal regeneration. *Curr Top Dev Biol* 2007;78:47–126.
- [10] Lungová V, Radlanski RJ, Tucker AS, Renz H, Míšek I, Matalová E. Tooth-bone morphogenesis during postnatal stages of mouse first molar development. *J Anat* 2011;218(6):699–716.
- [11] Hynes K, Menicanin D, Gronthos S, Bartold PM. Clinical utility of stem cells for periodontal regeneration. *Periodontol* 2000 2012;59(1):203–27.
- [12] Hu B, Nadiri A, Bopp-Kuchler S, Perrin-Schmitt F, Wang S, Lesot H. Dental epithelial histo-morphogenesis in the mouse: positional information versus cell history. *Arch Oral Biol* 2005;50(2):131–6.
- [13] Hu B, Nadiri A, Bopp-Kuchler S, Perrin-Schmitt F, Lesot H. Dental epithelial histomorphogenesis *in vitro*. *J Dent Res* 2005;84(6):521–5.
- [14] Nakao K, Morita R, Saji Y, Ishida K, Tomita Y, Ogawa M, et al. The development of a bioengineered organ germ method. *Nat Methods* 2007;4(3):227–30.
- [15] Gronthos S, Mankani M, Brahim J, Robey PG, Shi S. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) *in vitro* and *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000;97(25):13625–30.
- [16] Wang J, Liu X, Jin X, Ma H, Hu J, Ni L, et al. The odontogenic differentiation of human dental pulp stem cells on nanofibrous poly(L-lactic acid) scaffolds *in vitro* and *in vivo*. *Acta Biomater* 2010;6(10):3856–63.
- [17] Sakai VT, Zhang Z, Dong Z, Neiva KG, Machado MA, Shi S, et al. SHED differentiate into functional odontoblasts and endothelium. *J Dent Res* 2010;89(8):791–6.
- [18] Sonoyama W, Seo BM, Yamaza T, Shi S. Human Hertwig's epithelial root sheath cells play crucial roles in cementum formation. *J Dent Res* 2007;86(7):594–9.
- [19] Kuchler-Bopp S, Keller L, Poliard A, Lesot H. Tooth organ engineering: biological constraints specifying experimental approaches. In: Eberli D, editor. *Tissue engineering for tissue and organ regeneration*. Croatia: InTech; 2011. p. 317–46.
- [20] Nakagawa E, Itoh T, Yoshie H, Satokata I. Odontogenic potential of post-natal oral mucosal epithelium. *J Dent Res* 2009;88(3):219–23.
- [21] 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.
- [22] Ikeda E, Tsuji T. Growing bioengineered teeth from single cells: potential for dental regenerative medicine. *Expert Opin Biol Ther* 2008;8(6):735–44.
- [23] Nait Lechguer A, Couble ML, Labert N, Kuchler-Bopp S, Keller L, Magloire H, et al. Cell differentiation and matrix organization in engineered teeth. *J Dent Res* 2011;90(5):583–9.
- [24] 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.
- [25] 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.
- [26] Keller L, Kuchler-Bopp S, Mendoza SA, Poliard A, Lesot H. Tooth engineering: searching for dental mesenchymal cells sources. *Front Physiol* 2011;2:7.
- [27] Sonoyama W, Liu Y, Fang D, Yamaza T, Seo BM, Zhang C, et al. Mesenchymal stem cell-mediated functional tooth regeneration in swine. *PLoS One* 2006;1:e79.
- [28] Luan X, Ito Y, Diekwisch TGH. Evolution and development of Hertwig's epithelial root sheath. *Dev Dyn* 2006;235(5):1167–80.
- [29] Thomas HF. Root formation. *Int J Dev Biol* 1995;39(1):231–7.
- [30] Zeichner-David M, Oishi K, Su Z, Zakartchenko V, Chen LS, Arzate H, et al. Role of Hertwig's epithelial root sheath cells in tooth root development. *Dev Dyn* 2003;228(4):651–63.
- [31] Huang X, Xu X, Bringas Jr. P, Hung YP, Chai Y. Smad4-Shh-Nfic signaling cascade-mediated epithelial-mesenchymal interaction is crucial in regulating tooth root development. *J Bone Miner Res* 2010;25(5):1167–78.
- [32] Steele-Perkins G, Butz KG, Lyons GE, Zeichner-David M, Kim HJ, Cho MI, et al. Essential role for NFI-C/CTF transcription-replication factor in tooth root development. *Mol Cell Biol* 2003;23(3):1075–84.
- [33] Park JC, Herr Y, Kim HJ, Gronostajski RM, Cho MI. Nfic gene disruption inhibits differentiation of odontoblasts responsible for root formation and results in formation of short and abnormal roots in mice. *J Periodontol* 2007;78(9):1795–802.
- [34] Bosshardt DD, Nanci A. Hertwig's epithelial root sheath, enamel matrix proteins, and initiation of cementogenesis in porcine teeth. *J Clin Periodontol* 2004;31(3):184–92.
- [35] Atsumi Y, Imai T, Matsumoto K, Sakuda M, Maeda T, Kurisu K, et al. Effects of different types of injury to the inferior alveolar nerve on the behavior of Schwann cells during the regeneration of periodontal nerve fibers of rat incisor. *Arch Histol Cytol* 2000;63(1):43–54.
- [36] Ripamonti U, Petit JC. Bone morphogenetic proteins, cementogenesis, myoblastic stem cells and the induction of periodontal tissue regeneration. *Cytokine Growth Factor Rev* 2009;20(5–6):489–99.
- [37] Yamamoto T, Takahashi S. Hertwig's epithelial root sheath cells do not transform into cementoblasts in rat molar cementogenesis. *Ann Anat* 2009;191(6):547–55.
- [38] Bai Y, Bai Y, Matsuzaka K, Hashimoto S, Kokubu E, Wang X, et al. Formation of bone-like tissue by dental follicle cells co-cultured with dental papilla cells. *Cell Tissue Res* 2010;342(2):221–31.
- [39] Bai Y, Bai Y, Matsuzaka K, Hashimoto S, Fukuyama T, Wu L, et al. Cementum- and periodontal ligament-like tissue formation by dental follicle cell sheets co-cultured with Hertwig's epithelial root sheath cells. *Bone* 2011;48(6):1417–26.
- [40] Ho SP, Kurylo MP, Fong TK, Lee SSJ, Wagner HD, Ryder MI, et al. The biomechanical characteristics of the bone-periodontal ligament-cementum complex. *Biomaterials* 2010;31(25):6635–46.
- [41] Park CH, Rios HF, Jin Q, Bland ME, Flanagan CL, Hollister SJ, et al. Biomimetic hybrid scaffolds for engineering human tooth-ligament interfaces. *Biomaterials* 2010;31(23):5945–52.

- [42] 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.
- [43] Oshima M, Mizuno M, Imamura A, Ogawa M, Yasukawa M, Yamazaki H, et al. Functional tooth regeneration using a bioengineered tooth unit as a mature organ replacement regenerative therapy. *PLoS One* 2011;6(7):e21531.
- [44] Nait Lechguer A, Kuchler-Bopp S, Hu B, Haikel Y, Lesot H. Vascularization of engineered teeth. *J Dent Res* 2008;87(12):1138–43.
- [45] Yen AH, Sharpe PT. Stem cells and tooth tissue engineering. *Cell Tissue Res* 2008;331(1):359–72.
- [46] Honda MJ, Imaizumi M, Tsuchiya S, Morseczek C. Dental follicle stem cells and tissue engineering. *J Oral Sci* 2010;52(4):541–52.
- [47] Maeda T, Kannari K, Sato O, Iwanaga T. Nerve terminals in human periodontal ligament as demonstrated by immunohistochemistry for neurofilament protein (NFP) and S-100 protein. *Arch Histol Cytol* 1990;53(3):259–65.
- [48] Byers MR, Suzuki H, Maeda T. Dental neuroplasticity, neuro-pulpal interactions, and nerve regeneration. *Microsc Res Tech* 2003;60(5):503–15.
- [49] Magloire H, Maurin JC, Couble ML, Shibukawa Y, Tsumura M, Thivichon-Prince B, et al. Topical review. Dental pain and odontoblasts: facts and hypotheses. *J Orofac Pain* 2010;24(4):335–49.
- [50] Hildebrand C, Fried K, Tuisku F, Johansson CS. Teeth and tooth nerves. *Prog Neurobiol* 1995;45(3):165–222.
- [51] Fried K, Nosrat C, Lillesaar C, Hildebrand C. Molecular signaling and pulpal nerve development. *Crit Rev Oral Biol Med* 2000;11(3):318–32.
- [52] Luukko K, Kvinnsland IH, Kettunen P. Tissue interactions in the regulation of axon pathfinding during tooth morphogenesis. *Dev Dyn* 2005;234(3):482–8.
- [53] Dehmelt L, Halpain S. The MAP2/Tau family of microtubule-associated proteins. *Genome Biol* 2005;6(1):204.
- [54] Arthur A, Rychkov G, Shi S, Koblar SA, Gronthos S. Adult human dental pulp stem cells differentiate toward functionally active neurons under appropriate environmental cues. *Stem Cells* 2008;26(7):1787–95.
- [55] Arthur A, Shi S, Zannettino ACW, Fujii N, Gronthos S, Koblar SA. Implanted adult human dental pulp stem cells induce endogenous axon guidance. *Stem Cells* 2009;27(9):2229–37.
- [56] Mina M, Kollar EJ. The induction of odontogenesis in non-dental mesenchyme combined with early murine mandibular arch epithelium. *Arch Oral Biol* 1987;32(2):123–7.
- [57] Ohazama A, Modino SAC, Miletich I, Sharpe PT. Stem-cell-based tissue engineering of murine teeth. *J Dent Res* 2004;83(7):518–22.
- [58] Peterková R, Klepáček I, Peterka M. Prenatal development of rugae palatinae in mice: scanning electron microscopic and histologic studies. *J Craniofac Genet Dev Biol* 1987;7(2):169–89.
- [59] Pantalacci S, Prochazka J, Martin A, Rothova M, Lambert A, Bernard L, et al. Patterning of palatal rugae through sequential addition reveals an anterior/posterior boundary in palatal development. *BMC Dev Biol* 2008;8:116.
- [60] Otsu K, Kishigami R, Oikawa-Sasaki A, Fukumoto S, Yamada A, Fujiwara N, et al. Differentiation of induced pluripotent stem cells into dental mesenchymal cells. *Stem Cells Dev* 2012;21(7):1156–64.
- [61] Wen Y, Wang F, Zhang WC, Li YH, Yu MJ, Nan X, et al. Application of induced pluripotent stem cells in generation of a tissue-engineered tooth-like structure. *Tissue Eng Part A* 2012;18(15–16):1677–85.
- [62] Takahashi C, Yoshida H, Komine A, Nakao K, Tsuji T, Tomooka Y. Newly established cell lines from mouse oral epithelium regenerate teeth when combined with dental mesenchyme. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 2010;46(5):457–68.
- [63] Wang B, Li L, Du S, Liu C, Lin X, Chen Y, et al. Induction of human keratinocytes into enamel-secreting ameloblasts. *Dev Biol* 2010;344(2):795–9.
- [64] Hu B, Unda F, Bopp-Kuchler S, Jimenez L, Wang XJ, Haikel Y, et al. Bone marrow cells can give rise to ameloblast-like cells. *J Dent Res* 2006;85(5):416–21.
- [65] Huang GT, 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.
- [66] Gronthos S, Brahimi J, Li W, Fisher LW, Cherman N, Boyde A, et al. Stem cell properties of human dental pulp stem cells. *J Dent Res* 2002;81(8):531–5.
- [67] Cordeiro MM, Dong Z, Kaneko T, Zhang Z, Miyazawa M, Shi S, et al. Dental pulp tissue engineering with stem cells from exfoliated deciduous teeth. *J Endod* 2008;34(8):962–9.
- [68] Seo BM, Miura M, Gronthos S, Bartold PM, Batouli S, Brahimi J, et al. Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament. *Lancet* 2004;364(9429):149–55.

**B978-0-12-397157-9.00032-1, 00032**

## **Non-Print Items**

### **Abstract:**

As part of regenerative medicine, tooth organ engineering raises a series of distinct biological challenges to be solved before any clinical development can be considered. These include the finding of easily available cell sources, the maintenance of odontogenic properties of cultured cells, and the synchronization of very distinct biological processes. Summarizing the main achievements concerning the engineering of a complete tooth and attachment tissues (crown and root formation, functional differentiation of odontoblasts, ameloblasts and cementoblasts, periodontium attached to newly-formed bone), this review aims to point out the main questions that still need to be addressed. Taking into account the specificities of tooth development, the search for competent cells to be used for engineering will need to determine the simplest minimal requirements that have to be preserved. The loss of odontogenic properties *in vitro* raises the question of possible cell selection versus the relationship between microenvironment and cell phenotype. Addressing these questions will require a better understanding of cell homeostasis and heterogeneity during tooth development and engineering. Although methodological adjustments will be necessary when changing the cell sources, a lot remains to be done, still working with embryonic mouse dental cells. With this system, it will be necessary to search for the molecular mechanisms sustaining the “instructive potential” of the epithelium, as required for the specification of mesenchymal cells, the initiation of odontogenesis and later, the specification of a dental epithelial–mesenchymal junction.

**Keywords:** Organ engineering, cell sources, epithelial–mesenchymal interaction, odontogenic potential, tooth–bone interaction

**Vishwakarma, 978-0-12-397157-9**

## **Chapitre 2 :**

### **L'immuno-modulation stimule l'innervation des dents obtenues en ingénierie dentaire.**

**Kökten T, Bécavin T, Keller L, Weickert J-L, Kuchler-Bopp S, Lesot H (2014).** Immunomodulation stimulates the innervation of engineered tooth organ. *PLoS ONE* 9: *e86011*.

## **Objectifs :**

La stratégie d'ingénierie tissulaire dentaire développée par notre équipe permet de régénérer un organe dentaire dans son intégralité. Cependant, afin que les dents obtenues soient physiologiquement fonctionnelles, la vascularisation et l'innervation de celles-ci semblent être indispensables. Le réseau vasculaire se met en place systématiquement après implantation des réassociations cellulaires cultivées. En revanche, nous avons vu que la mise en place du réseau nerveux nécessite certaines conditions. Notre objectif est donc d'identifier les éléments nécessaires pour obtenir l'innervation de la pulpe de nos réassociations cellulaires implantées. Dans ce but, différentes techniques d'implantations ont été réalisées chez plusieurs modèles murins. Les résultats obtenus pour chaque situation ont été comparés entre-elles puis à des dents physiologiques issues de différents stades du développement.

## **Méthodes :**

Pour ces travaux, des réassociations cellulaires ont été réalisées à partir de cellules dentaires embryonnaires, de la même manière que précédemment. Après 8 jours de culture *in vitro*, ces réassociations ont été implantées en sous-cutané chez différents modèles murins : souris ICR adultes, souris ICR adultes traitées à la cyclosporine A (Néoral®) et souris immunodéficientes (Nude) adultes. Une autre méthode expérimentale a consisté à co-cultiver pendant une nuit les réassociations cellulaires avec un ganglion trigéminal (TG) avant de les co-implanter chez ces différents modèles murins. Dans chaque cas, les implants ont été analysés après une et deux semaines d'implantation. L'histologie et la microscopie électronique à transmission (MET) ont permis d'analyser le bon déroulement de la morphogenèse coronaire, l'histogenèse épithéliale, la différenciation fonctionnelle des cellules ainsi que la rhizagenèse. La mise en place de la vascularisation du mésenchyme dentaire a été détectée en immunofluorescence indirecte. De plus, l'utilisation d'anticorps spécifiques, nous a permis de mettre en évidence la présence de vaisseaux avec différents degrés de maturation. En effet, les vaisseaux immatures ont été révélés à l'aide d'anticorps dirigés contre les antigènes CD31 et CD34 marquant les cellules endothéliales. Tandis que les vaisseaux matures ont été révélés à l'aide d'anticorps dirigés contre les antigènes CD146



marquant les cellules endothéliales et les péricytes et  $\alpha$ -SMA marquant les péricytes associés aux vaisseaux. La révélation, au sein des implants, des fibres nerveuses et des cellules de Schwann a également été réalisée en immunofluorescence indirecte. Pour cela, nous avons utilisé un anticorps dirigé contre l'antigène péricérine marquant une protéine des filaments intermédiaires spécifiques du système nerveux périphérique, et un anticorps dirigé contre l'antigène S100 $\beta$  marquant une protéine de fixation du calcium intra-cytosolique exprimée par les cellules de Schwann. Finalement une analyse morphologique et structurale du ganglion trigéminal ainsi que des implants innervés a été réalisée en microscopie électronique à transmission.

## **Résultats et discussion :**

### **Développement des réassociations cellulaires implantées deux semaines chez les différents modèles murins**

Les réassociations cellulaires cultivées et implantées deux semaines chez les souris ICR traitées à la cyclosporine A et les souris immunodéficientes (Nude) ne présentent aucune différence par rapport à celles implantées chez les souris ICR (Nait Lechguer et al., 2011). Dans chaque situation, la morphogénèse coronaire est correcte et la formation des racines est initiée. Des vaisseaux sanguins sont observés dans le mésenchyme péri-dentaire ainsi que dans la partie basale et centrale de la pulpe dentaire. A ce stade, ces vaisseaux atteignent les odontoblastes qui sont allongés et polarisés. En effet, nous pouvons observer un pôle basal contenant le noyau opposé au pôle apical sécrétoire contenant des granules de sécrétion. Entre les odontoblastes, des jonctions intercellulaires comme les desmosomes et des jonctions intermédiaires (ou *zonula-adherens*) spécifiques aux cellules polarisées sont mises en évidence en microscopie électronique à transmission (MET). Ces résultats montrent que ces cellules sont bien fonctionnelles et qu'elles sécrètent la pré-dentine/dentine. Des tubules dentinaires sont présents au sein de cette matrice et atteignent la jonction dentine-émail.

Les améloblastes sont allongés et polarisés avec un pôle basal distant par rapport au pôle apical sécrétoire qui se trouve au contact de l'émail qu'ils sécrètent. Les analyses en histologie et en MET permettent de distinguer l'émail interne de l'émail externe. L'orientation des cristaux est parallèle dans l'émail externe alors qu'elle est désorganisée dans l'émail

interne, qui est au contact de la dentine. Au contact du pôle basal des améloblastes, des cellules aplaties forment le stratum intermedium. Des vaisseaux sanguins sont également observés au contact de cette monocouche cellulaire.

A la limite de la jonction couronne/racine, les cémentoblastes sécrètent du ciment à la surface externe de la dentine racinaire. Au niveau de cette matrice, sont ancrées des cellules mésenchymateuses allongées qui forment le ligament péri-dentaire. Ces cellules s'étendent jusqu'à de l'os néoformé au sein de l'implant.

Ces résultats obtenus sont également observés dans le cas des réassociations cellulaires co-cultivées pendant une nuit et co-implantées avec un ganglion trigéminal. Ce qui suggère que le ganglion nerveux n'altère en rien le développement de la dent.

### **Innervation des réassociations cellulaires implantées chez les souris ICR**

Après deux semaines d'implantation, les réassociations cellulaires atteignent un stade du développement équivalent à celui d'une première molaire inférieure issue d'un stade post-natal 4 jours (PN4). En effet, dans les deux cas, le développement coronaire, le dépôt des matrices et leur minéralisation sont similaires. Cependant, l'innervation de la pulpe est différente.

En effet à PN4, des fibres nerveuses positives pour l'anticorps dirigé contre l'antigène périphérine sont observées au niveau du mésenchyme péri-dentaire et de la pulpe dentaire. Alors que pour les réassociations cellulaires, après une et même deux semaines d'implantation, aucune fibre nerveuse n'est détectée au niveau de l'implant. En revanche, pour les mêmes périodes d'implantation, les réassociations sont entièrement vascularisées. Des vaisseaux sanguins positifs à l'anticorps dirigé contre l'antigène CD31 sont observés au niveau du mésenchyme péri-dentaire et de la pulpe dentaire. Des résultats préliminaires obtenus au laboratoire avaient montré, après implantation des réassociations cellulaires chez des souris GFP positives, que tous les vaisseaux étaient positifs à l'anticorps dirigé contre l'antigène GFP. Ce résultat avait ainsi montré que l'ensemble des vaisseaux présent dans le mésenchyme dentaire provenait de l'hôte (Nait Lechguer et al., 2008). Ainsi, nous pouvons constater que dans nos conditions expérimentales, l'hôte participe à la vascularisation des réassociations cellulaires implantées mais pas à leur innervation.

Pour pallier ce problème, les réassociations cellulaires ont été co-implantées avec un ganglion trigéminal. Après une semaine d'implantation, des fibres nerveuses détectées à l'aide d'un anticorps anti-périphérine sont observées au niveau des tissus péri-dentaires. A deux semaines, ces fibres nerveuses atteignent la limite entre le mésenchyme péri-dentaire et la pulpe sans jamais pénétrer dans la pulpe dentaire. Un apport nerveux est donc nécessaire pour obtenir des fibres nerveuses au sein des implants mais il n'est pas suffisant pour l'innervation de la pulpe dentaire.

### **Innervation des réassociations cellulaires implantées chez les souris ICR traitées à la cyclosporine A (Néoral®)**

En 2011, Siemionow *et coll.*, ont montré pour les transplantations faciales que l'utilisation de la cyclosporine A (CsA), un immunosuppresseur, réduit le risque de rejet et facilite la ré-innervation de la greffe en stimulant la croissance axonale.

Nous avons donc modifié notre stratégie expérimentale en co-implantant nos réassociations cellulaires avec un ganglion trigéminal chez des souris ICR traitées à la CsA par voie orale. Après une semaine d'implantation, des vaisseaux sanguins CD31 positifs sont observés au niveau du mésenchyme péri-dentaire, de la pulpe dentaire et de la couche odontoblastique. A ce stade, 88% de nos réassociations implantées sont innervées. En effet, des fibres nerveuses sont visualisées à l'aide d'un anticorps anti-périphérine au niveau du mésenchyme péri-dentaire et de la pulpe dentaire. Dans la partie apicale de la pulpe dentaire, des accolements sont détectés entre les fibres nerveuses et les vaisseaux sanguins. Des résultats similaires sont observés après deux semaines d'implantation pour 92% de nos réassociations cellulaires. Cependant à ce stade, nous avons observé des vaisseaux sanguins avec différents degrés de maturation. Des vaisseaux immatures positifs aux CD31 et CD34 (marqueurs endothéliaux) ainsi que des vaisseaux matures positifs au CD146 (marqueur endothélial et des cellules associées aux vaisseaux) sont observés dans l'ensemble du mésenchyme dentaire. En revanche des vaisseaux matures positifs à l' $\alpha$ -SMA (marqueur des péricytes associés aux vaisseaux) sont observés uniquement dans la partie apicale de la pulpe dentaire. Les axones forment des complexes neuro-vasculaires avec les vaisseaux immatures (CD31 et CD34 positifs). En revanche, ils sont uniquement à proximité des vaisseaux matures (CD146 et  $\alpha$ -SMA positifs).

Le marquage des odontoblastes par un anticorps anti-nestine et des axones par un anticorps anti-périphérine montre qu'à une et deux semaines d'implantation, les fibres nerveuses atteignent la couche odontoblastique et sont au contact de la dentine. Ce résultat est comparable à celui obtenu pour une dent physiologique à PN7. En revanche, contrairement à ce que l'on a pu observer au stade PN10, aucune fibre nerveuse n'ont été visualisées dans les tubules dentinaires de nos réassociations cellulaires.

Après deux semaines d'implantation, nous avons aussi observé la présence de cellules de Schwann (positives à l'anticorps anti-S100 $\beta$ ) à proximité des fibres nerveuses, au niveau du mésenchyme péri-dentaire et de la pulpe dentaire. Ces cellules dont le réticulum endoplasmique rugueux est particulièrement développé, sont également observées en MET dans le mésenchyme dentaire des réassociations implantées. L'analyse du ganglion trigéminal en MET, montre la présence d'axones myélinisés et non-myélinisés. En revanche, la pulpe dentaire des réassociations implantées possède uniquement des axones non-myélinisés. Cependant, Qian and Naftel, (1996) ont montré que chez le rat adulte, la pulpe dentaire des molaires possède les deux types de fibres nerveuses. Nous avons remarqué que dans la pulpe de nos réassociations dentaires, les axones présentent à certains endroits de leur membrane plasmique des zones d'épaississements. Ce résultat révèle donc la présence de contacts synaptiques entre les fibres nerveuses. De plus, les vésicules de sécrétion au niveau de ces zones de contact suggèrent que les axones sont fonctionnels.

### **Innervation des réassociations cellulaires implantées chez les souris immunodéficientes (Nude)**

En plus de son action immunosuppressive, la CsA stimule la croissance des fibres nerveuses en induisant l'expression de la protéine GAP-43 dans les cônes de croissance axonale (Wen et al., 2004; Ibarra et al., 2007). Pour éviter cette ambiguïté, nous avons implanté nos réassociations cellulaires en présence ou non d'un ganglion trigéminal, chez des souris immunodéficientes (Nude) adultes. Cette méthode expérimentale nous permettrait ainsi de mettre en évidence uniquement le rôle du système immunitaire dans l'innervation des réassociations dentaires.

Dans le cas des réassociations cellulaires implantées sans ganglion trigéminal, aucune fibre nerveuse n'a été observée au sein des implants. Ce résultat est similaire, pour les mêmes

conditions expérimentales, à celui obtenu pour les implantations chez les souris ICR adultes. Ce qui confirme la non-participation de l'hôte à l'innervation de nos réassociations cellulaires. Dans nos conditions expérimentales, un apport nerveux est donc indispensable.

Ainsi, lorsque les réassociations cellulaires sont co-implantées avec un ganglion trigéminal, 87% de nos implants sont innervés après une semaine d'implantation. Des fibres nerveuses ainsi que des vaisseaux sanguins sont visualisées au niveau du mésenchyme péri-dentaire et de la pulpe dentaire. Ces axones forment des complexes neuro-vasculaires dans la partie basale et centrale de la pulpe dentaire. A ce stade, contrairement aux vaisseaux qui atteignent la couche odontoblastique, les fibres nerveuses sont détectées uniquement dans la partie basale des odontoblastes. Chez ce modèle animal, la croissance axonale est donc retardée par rapport aux implantations chez les souris ICR traitées à la CsA. Cette différence est probablement due à l'effet positif de la CsA sur la croissance axonale.

Après deux semaines d'implantation, nous obtenons une proportion de réassociations dentaires innervées similaire à celle obtenue après une semaine (90%). A ce stade, comme pour les implants chez les souris ICR traitées à la CsA, des vaisseaux sanguins avec différents degrés de maturation ont été détectés dans l'ensemble de la pulpe dentaire. Les axones forment des complexes neuro-vasculaires avec les vaisseaux immatures (CD31 et CD34 positifs) alors qu'ils sont seulement à proximité des vaisseaux matures (CD146 positifs). En revanche après deux semaines d'implantation, les axones atteignent la couche odontoblastique. Le marquage des odontoblastes par un anticorps anti-nestine et des axones par un anticorps anti-périphérine, montre la présence de fibres nerveuses entre les odontoblastes et au contact de la dentine. Cependant, aucune fibre nerveuse n'a été détectée au sein des tubules dentinaires. Ce résultat est comparable à celui obtenu pour les souris ICR traitées à la CsA, pour une durée d'implantation équivalente.

De plus, nous avons remarqué que le pourcentage de dents innervées pour les réassociations cellulaires implantées chez les souris Nude est comparable à celui obtenu pour celles implantées chez les souris ICR traitées à la CsA, après une (respectivement 87% vs. 88%) et deux (respectivement 92% vs. 90%) semaines d'implantation. Ce résultat nous montre clairement que l'immuno-modulation interfère et est suffisante pour l'innervation de la pulpe dentaire de nos réassociations cellulaires implantées.

Finalement, par ces travaux nous avons montré que quel que soit le modèle murin choisi, le développement des réassociations cellulaires implantées est similaire. Après deux

semaines d'implantation, les réassociations dentaires sont comparables à une dent physiologique au stade PN4. La co-culture ainsi que la co-implantation avec un ganglion trigéminal n'altère pas le développement dentaire. L'innervation de nos implants n'est possible qu'en présence de cet apport nerveux. Les axones provenant du ganglion trigéminal pénètrent uniquement dans la pulpe dentaire des réassociations cellulaires implantées chez les souris immunodéprimées (traitées à la CsA et Nude). L'immuno-modulation est donc nécessaire et suffisante pour obtenir une innervation dentaire. Après deux semaines d'implantation, l'innervation pulpaire de nos réassociations dentaires est comparable à celle d'une dent physiologique au stade PN7. Des accolements entre les fibres nerveuses et les vaisseaux sanguins sont observés dans l'ensemble de la pulpe dentaire. Ce résultat est également similaire à ce qui est observé pour une dent physiologique.



# Immunomodulation Stimulates the Innervation of Engineered Tooth Organ

Tunay Kökten<sup>1,2</sup>, Thibault Bécavin<sup>1</sup>, Laetitia Keller<sup>1</sup>, Jean-Luc Weickert<sup>3</sup>, Sabine Kuchler-Bopp<sup>1,2</sup>, Hervé Lesot<sup>1,2\*</sup>

**1** Institut National de la Santé Et de la Recherche Médicale (INSERM) Unité Mixte de Recherche (UMR)1109, team “Osteoarticular and Dental Regenerative NanoMedicine”, Faculté de Médecine, Université de Strasbourg, Strasbourg, France, **2** Faculté de Chirurgie Dentaire, Université de Strasbourg, Strasbourg, France, **3** Service de Microscopie Electronique, Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire (IGBMC), INSERM Unité (U)964, Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS) UMR1704, Université de Strasbourg, Illkirch, France

## Abstract

The sensory innervation of the dental mesenchyme is essential for tooth function and protection. Sensory innervation of the dental pulp is mediated by axons originating from the trigeminal ganglia and is strictly regulated in time. Teeth can develop from cultured re-associations between dissociated dental epithelial and mesenchymal cells from Embryonic Day 14 mouse molars, after implantation under the skin of adult ICR mice. In these conditions however, the innervation of the dental mesenchyme did not occur spontaneously. In order to go further with this question, complementary experimental approaches were designed. Cultured cell re-associations were implanted together with trigeminal ganglia for one or two weeks. Although axonal growth was regularly observed extending from the trigeminal ganglia to all around the forming teeth, the presence of axons in the dental mesenchyme was detected in less than 2.5% of samples after two weeks, demonstrating a specific impairment of their entering the dental mesenchyme. In clinical context, immunosuppressive therapy using cyclosporin A was found to accelerate the innervation of transplanted tissues. Indeed, when cultured cell re-associations and trigeminal ganglia were co-implanted in cyclosporin A-treated ICR mice, nerve fibers were detected in the dental pulp, even reaching odontoblasts after one week. However, cyclosporin A shows multiple effects, including direct ones on nerve growth. To test whether there may be a direct functional relationship between immunomodulation and innervation, cell re-associations and trigeminal ganglia were co-implanted in immunocompromised Nude mice. In these conditions as well, the innervation of the dental mesenchyme was observed already after one week of implantation, but axons reached the odontoblast layer after two weeks only. This study demonstrated that immunodepression *per se* does stimulate the innervation of the dental mesenchyme.

**Citation:** Kökten T, Bécavin T, Keller L, Weickert J-L, Kuchler-Bopp S, et al. (2014) Immunomodulation Stimulates the Innervation of Engineered Tooth Organ. PLoS ONE 9(1): e86011. doi:10.1371/journal.pone.0086011

**Editor:** Christophe Egles, Université de Technologie de Compiègne, France

**Received:** October 24, 2013; **Accepted:** December 4, 2013; **Published:** January 22, 2014

**Copyright:** © 2014 Kökten et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Funding:** Tunay Kökten was funded by the Dental School from the Université de Strasbourg. This work was partially supported by the project NanoOscar from the ANR. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

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

\* E-mail: lesot@unistra.fr

## Introduction

Teeth can develop from cultured and implanted re-associations between dissociated dental epithelial and mesenchymal cells from Embryonic Day (ED) 14 mouse molars. In these experimental conditions, it is possible to reproduce the epithelial-mesenchymal interactions, which control odontogenesis during embryonic development. This approach allows the progressive steps involved in odontogenesis to proceed: crown morphogenesis, epithelial histogenesis, the initiation of root formation and the functional differentiation of odontoblasts, ameloblasts and cementoblasts [for review see [1]]. These steps were completed already after two weeks of implantation under the skin of adult ICR mice [2]. Other non-dental cell types have also been successfully used to replace either the mesenchymal [3] or epithelial dental embryonic cells [4–7]. In these conditions however, the other interacting tissue, the inductor, still needs to have a dental origin.

Still, very little is known about the innervation of engineered teeth. The sensory innervation of the dental mesenchyme is essential for tooth protection. Together with the innervation of the

periodontium, it is also a key parameter for tooth function, by the perception of mechanical stress. Since odontoblasts are mechanosensory cells, the presence of nerve fibers in this cell layer is particularly important. Nevertheless, the way odontoblasts interact with and signal to axons is still unclear [8]. The presence of different types of glial cells next to the odontoblast layer and their relationship with microvascularization have been investigated in detail recently and illustrate the complexity of the cellular network involved in the process [9]. Sensory innervation of the dental pulp is mediated by axons originating from the trigeminal ganglion and is strictly regulated in time [10,11]. The late innervation of the dental pulp during development, despite the presence of neurotrophic factors in it, suggested the involvement of inhibitory molecules at early stages [12,13].

The innervation of the dental mesenchyme did not occur spontaneously when implanting cultured dental cell re-associations under the skin of adult ICR mice [1]. A specific study was thus developed, aiming to go further in detail with this question. For that purpose, complementary experimental approaches have been

designed, using mouse dental embryonic cells [2]. Cultured dental cell re-associations were implanted under the skin of adult ICR mice for one or two weeks, either alone or together with trigeminal ganglia and used as control experiments. In the clinical context of face transplantation, it had been shown that immunosuppressive therapy accelerated the innervation of transplanted tissues [14]. cyclosporin A (CsA), which reversibly inhibits T-lymphocyte function, has been widely used in organ transplantation [15]. Co-implantations of cultured dental cells with trigeminal ganglia were thus performed in CsA-treated ICR mice. However, CsA also has direct effect on nerve growth [16]. To check whether immunosuppression itself could interfere with the innervation of dental tissues, co-implantations were performed in Nude mice. The results demonstrated that immunodepression *per se* stimulates the innervation of the dental mesenchyme.

## Materials and Methods

### Animals and tissues

All procedures were designed in compliance with the recommendations of the European Union (2010/63/EU) for the care and use of laboratory animals. ICR mice (Charles River Laboratories, l'Arbresle, France) were mated overnight and the detection of the vaginal plug was determined as Embryonic Day (ED) 0. First lower molars were dissected from embryos at ED14 and trigeminal ganglia were dissected under a stereomicroscope (Leica MZ95, Nanterre, France) from newborn ICR mice PostNatal day (PN) 0 to 3. For immunosuppression, CsA (Néoral® Novartis, Rueil-Malmaison, France) was added to drinking water (1.2 ml Néoral®/L), one week before and all along the implantation period. The water containing CsA was changed every two days.

### Ethics statement

Experiments followed current European Union regulations (Directive 2010/63/EU), and were performed according to authorized investigator Dr. N. Jessel (Director of the «Osteoarticular and Dental Regenerative Nanomedicine» Team), holder of a personal license from «Préfecture du Bas-Rhin» (No. 67-315), who oversaw experiments done on mice.

All experiments were realized in the “Animalerie Centrale de la Faculté de Médecine de Strasbourg” with the approval number: A 67-482-35 from the Veterinary Public Health Service of the “Préfecture du Bas-Rhin”, representing the French Ministry of Agriculture, Department of Veterinary Science.

ICR mice (Charles River Laboratories, l'Arbresle, France) were mated overnight and the detection of the vaginal plug was determined as Embryonic Day (ED) 0. First lower molars for dental cell re-associations were all dissected from embryos at embryonic day 14. For this, pregnant mice were injected with a sub-lethal dose of pentobarbital (Centravet, Nancy, France) and embryos were delivered by caesarean section and decapitated. The age of the oldest embryos were sacrificed at ED14.

For further tissues implantations, all surgery was performed under Ketamine and Xylazine anesthesia, and all efforts were made to minimize suffering.

### Re-associations and *in vitro* culture

The dental epithelium and mesenchyme of ED14 mouse lower molars were dissociated by using 0.25% trypsin (BD Bioscience, Pont de Claix, France) and 1.2 U/mL dispase (Roche, Penzberg, Germany) in DMEM-F12 (Invitrogen, Villebon-sur-Yvette, France) (preheated to 37°C) at room temperature for 15 min. After separation of the dental epithelium from mesenchyme, each

tissue was further dissociated into single cells. These were passed through a 70 µm nylon and pelleted by centrifugation at 9000 g for 2 min. The pellets containing mesenchymal and epithelial single cells were cut into fragments, re-associated and cultured on a semi-solid medium. This culture medium consisted of DMEM-F12 containing 20% FBS (PAA, Les Mureaux, France), 0.10 mg/mL of ascorbic acid (Merck, Lyon, France), 2 mM of L-glutamine (Invitrogen, Villebon sur Yvette, France), 50 U/ml of penicillin/streptomycin (Invitrogen, Villebon sur Yvette, France), and 0.36% of agar (Sigma-Aldrich, Lyon, France). Cultures were performed at 37°C in a humidified atmosphere of 5% CO<sub>2</sub> for 8 days. The medium was changed every two days [17]. The trigeminal ganglia (TG) were dissected from ICR mice (PostNatal day (PN) 0 to 3) under a stereomicroscope (Leica MZ95, Nanterre, France) and co-cultured with dental cell re-associations overnight on semi-solid medium, just before implantation.

### *In vivo* implantation

The dental cell re-associations were cultured for 7 days and further co-cultured overnight with trigeminal ganglia (TG) before implantation between skin and muscles, behind the ears of ICR (152 samples) (Charles River Laboratories, l'Arbresle, France), CsA-treated ICR (229 samples) or Nude (NMRI-nu/nu, Janvier Labs, Saint Berthevin, France) (98 samples) adult mice [2]. Cell re-associations were also implanted without trigeminal ganglia and used as controls (42 samples in ICR, 55 samples in CsA-treated ICR and 28 samples in Nude adult mice). The mice were anaesthetized by intraperitoneal injection of 100 mg/g of ketamine (Virbac, Centravet, Nancy, France) and 10 mg/g of Xylazine (Rompun® 2%, Centravet, Nancy, France). The implantations were maintained *in vivo* for one or two weeks. Then, implanted mice were sacrificed by lethal injection of pentobarbital (Centravet, Nancy, France) and the implants were harvested for either histological analysis, or immunostaining, or transmission electron microscopy (TEM).

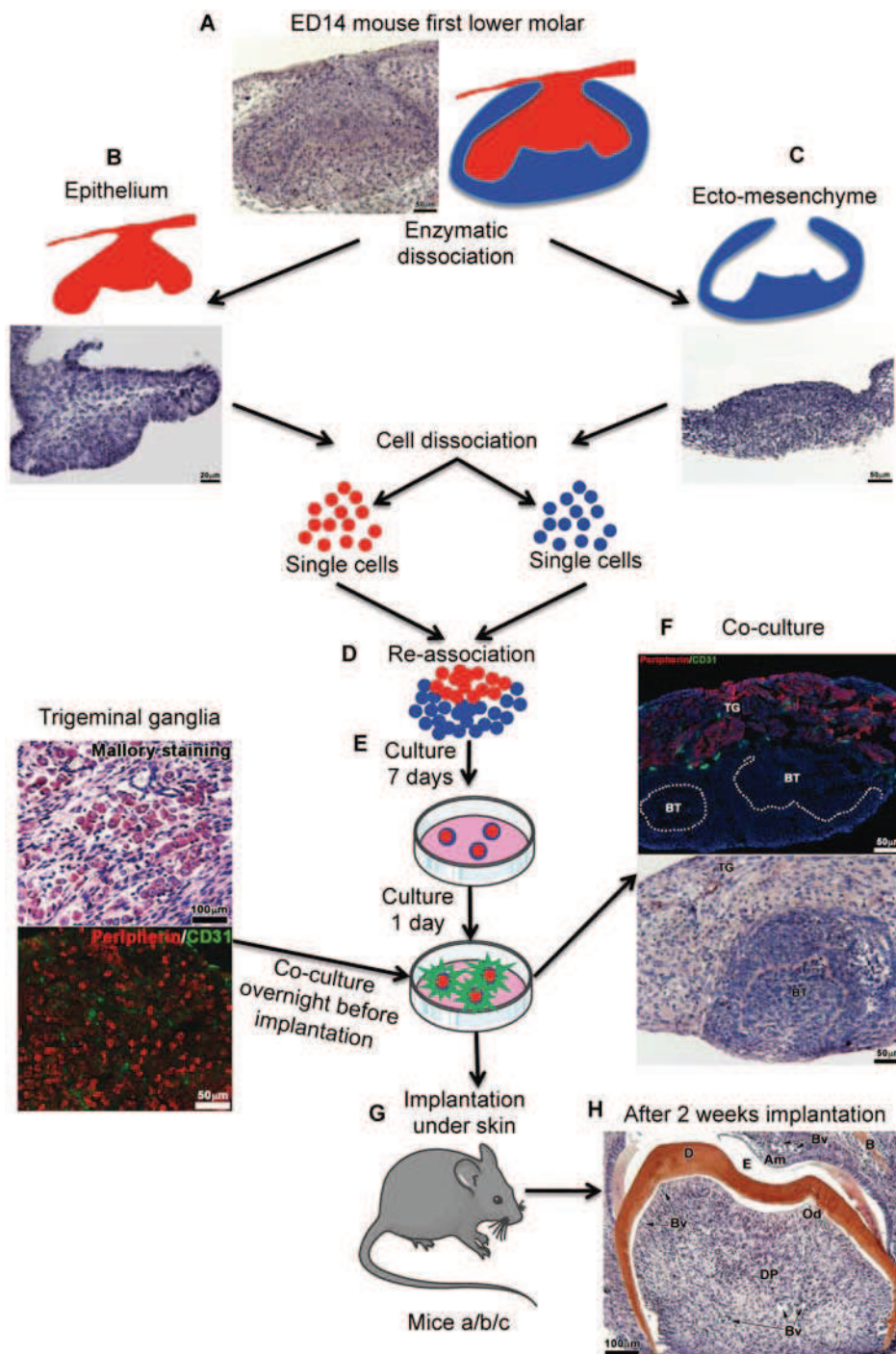
### Histology

For histology, samples were fixed for 24 h in Bouin-Hollande and embedded in paraffin. Serial sections (7 µm) were stained with Mallory's stain. After long-term implantations, the samples were demineralized in 15% EDTA for 48 h.

### Fixation protocols and immunofluorescence

After skin removal, heads from PN3, PN4, PN7 and PN10 ICR mice were fixed for 6 h in 4% paraformaldehyde at 4°C. Then, the heads were immersed overnight in PBS containing 5% sucrose at 4°C, and then for 6 h in PBS containing 20% sucrose at 4°C. Before immunostaining, mouse heads at PN7 and PN10 were demineralized in 15% EDTA for 2 weeks. Finally, the samples were embedded in Tissue-Tek® OCT (Agar Scientific, Saclay, France) and frozen at -20°C overnight and then at -80°C. Dissected ED14 molars, trigeminal ganglia, as well as cultured and implanted samples were washed in PBS, mounted in Tissue Tek® (OCT) and frozen. All frozen samples were stored at -80°C before serial sectioning (10 µm) on a cryostat (Leica, CM3000).

Serial sections were rinsed with PBS and fixed for 10 min with 4% paraformaldehyde at 4°C. After washing three times for 5 min in PBS at room temperature, tissue sections were incubated for 30 min at room temperature in a blocking solution of 1% bovine serum albumin (BSA) and then incubated for 2 h with the primary antibodies at room temperature. Blood vessels were stained using rat monoclonal anti-mouse CD31 (1/200, BD Pharmingen, Evry, France) [18], rat monoclonal anti-mouse CD34 (1/100, Ozyme, Saint Quentin Yvelines, France), polyclonal goat anti-mouse



**Figure 1. Protocol for tooth organ engineering.** The mandibular first molars were dissected from ICR mouse embryos at embryonic day (ED) 14 (cap stage) (A). Then, the dental epithelium (B) and ecto-mesenchyme (C) were separated by using a mixture of 0.25% trypsin and 1.2 U/mL dispase in DMEM-F12 (preheated to 37°C) at room temperature during 15 min. Each tissue was dissociated into single cells, which were then re-associated (D) and grown on semi-solid cultured medium (E). After 7 days *in vitro*, each re-association was co-cultured overnight with trigeminal ganglia from ICR newborn mice (F). The eighth day (G), bioengineered tooth unit and trigeminal ganglia were co-implanted between skin and muscles behind the ears in adult ICR mice (mice a), CsA-treated ICR mice (mice b) and Nude mice (mice c) for 1 week or 2 weeks (H). BT, bioengineered tooth; TG, trigeminal ganglia.

doi:10.1371/journal.pone.0086011.g001

CD146 (1/100, Santa Cruz, USA) or polyclonal rabbit anti-mouse  $\alpha$ -SMA antibody (1/100, Abcam®, Cambridge, MA, USA). Nerve fibers were immunostained for the type III intermediate filament protein peripherin (polyclonal rabbit anti-mouse peripherin, 1/

800, Abcam®, Cambridge, MA, USA). Ondotoblasts were immunostained using a polyclonal rabbit anti-mouse nestin antibody (1/50, tebu-bio, Le Perray en Yvelines, France). Schwann cells were immunostained by polyclonal goat anti-mouse



S100  $\beta$  chain antibody (1/100, Santa Cruz, USA). Following incubation, tissue sections were washed three times for 5 min each in PBS and incubated in the secondary antibody solution for 1 h at room temperature. Secondary antibodies were: donkey polyclonal anti-rat conjugated to Alexa 488 (1/200, Invitrogen, Villebon sur Yvette, France), donkey polyclonal anti-rabbit conjugated to Alexa 488 (1/200, Invitrogen, Villebon sur Yvette, France), donkey polyclonal anti-goat conjugated to Alexa 488 (1/200, Invitrogen, Villebon sur Yvette, France) and donkey polyclonal anti-rabbit IgG conjugated to Alexa 594 antibodies (1/500, Invitrogen, Villebon sur Yvette, France). Negative controls were performed with corresponding sera instead of the primary antibody. After secondary incubation, sections were washed three times for 5 min each in PBS at room temperature. Slides were mounted in fluorescence mounting medium (Dako, Trappes, France) and observed with a microscope (Leica DM4000B) equipped for fluorescence.

### Transmission Electron Microscopy

The samples were fixed by immersion in 2.5% glutaraldehyde and 2.5% paraformaldehyde in cacodylate buffer (0.1 M, pH 7.4), demineralized in 15% EDTA for 2 weeks, and post-fixed in 1% osmium tetroxide in 0.1 M cacodylate buffer for 1 h at 4°C and dehydrated through graded alcohol (50, 70, 90, 100%) and propylene oxide for 30 min each under agitation. Samples were embedded in Epon 812. Semi-thin sections were cut at 2  $\mu$ m with an ultra microtome (Leica Ultracut UCT) and stained with toluidine blue, and histologically analyzed by light microscopy. Ultrathin sections were cut at 70 nm and contrasted with uranyl acetate and lead citrate and examined at 70 kv with a Morgagni 268 D electron microscope. Images were captured digitally by Mega View III camera (Soft Imaging System).

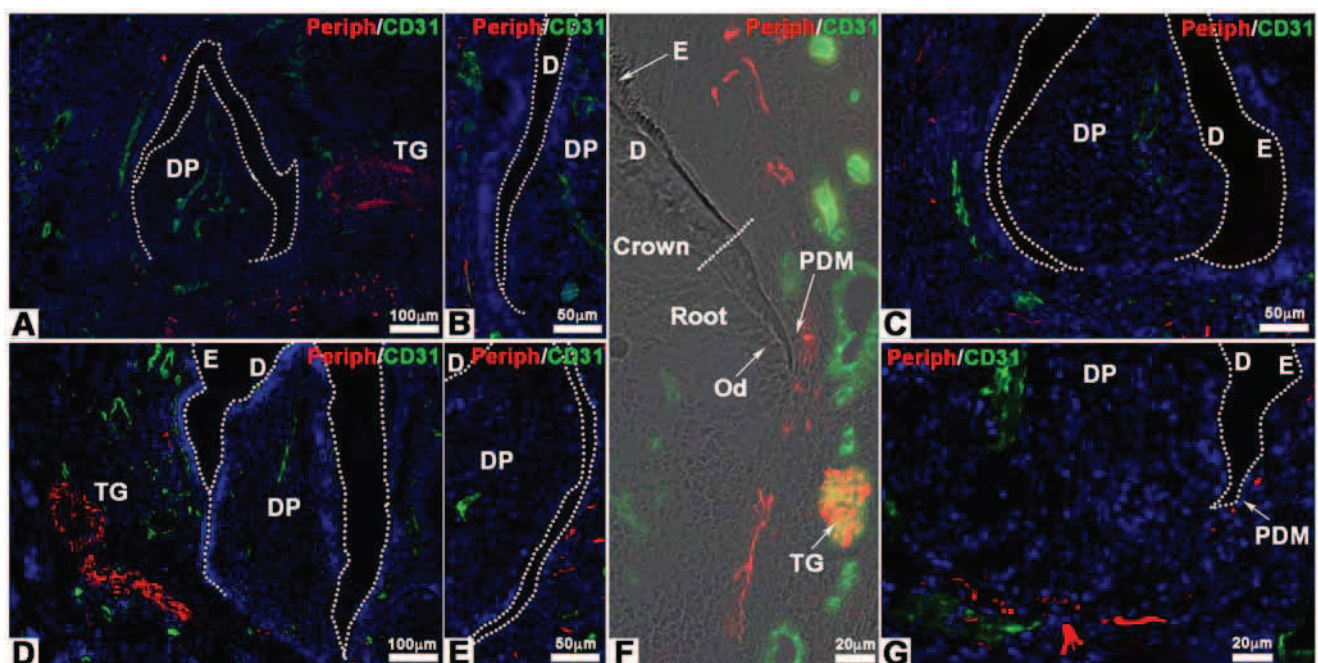
## Results

### Attempts to innervate bioengineered teeth implanted in ICR mice

Cultured cell re-associations have been implanted alone (42 re-associations) or co-implanted with trigeminal ganglia (152 re-associations) for one or two weeks under the skin of ICR adult mice (Fig. 1). In these conditions the crown formed and root development was initiated (Fig. 1H). Double immunostainings were performed using antibodies against peripherin to detect nerve fibers and against CD31 to visualize blood vessels (Fig. 2). Although re-associations were fully vascularized (Figs. 2A–G), nerve fibers originating from the host never entered the dental mesenchyme (Fig. 1I in [1]), neither after one week of implantation (0/18 samples) nor after two weeks (0/24 samples). Even when cell re-associations were implanted together with trigeminal ganglia, nerve fibers did not enter the dental pulp after one week (Figs. 2A–C; 0/29 samples). In most cases (120/123 samples) after two weeks of implantation, the results remained negative (Figs. 2D–G). Nerve fibers extended only in the tissues surrounding the forming tooth (Figs. 2A–G) and reached the limit between the peridental mesenchyme and the dental pulp (Fig. 2F, G). Only for 3 of the 123 re-associations co-implanted with trigeminal ganglia for two weeks, immunostaining for peripherin was positive in the dental mesenchyme (2,44%).

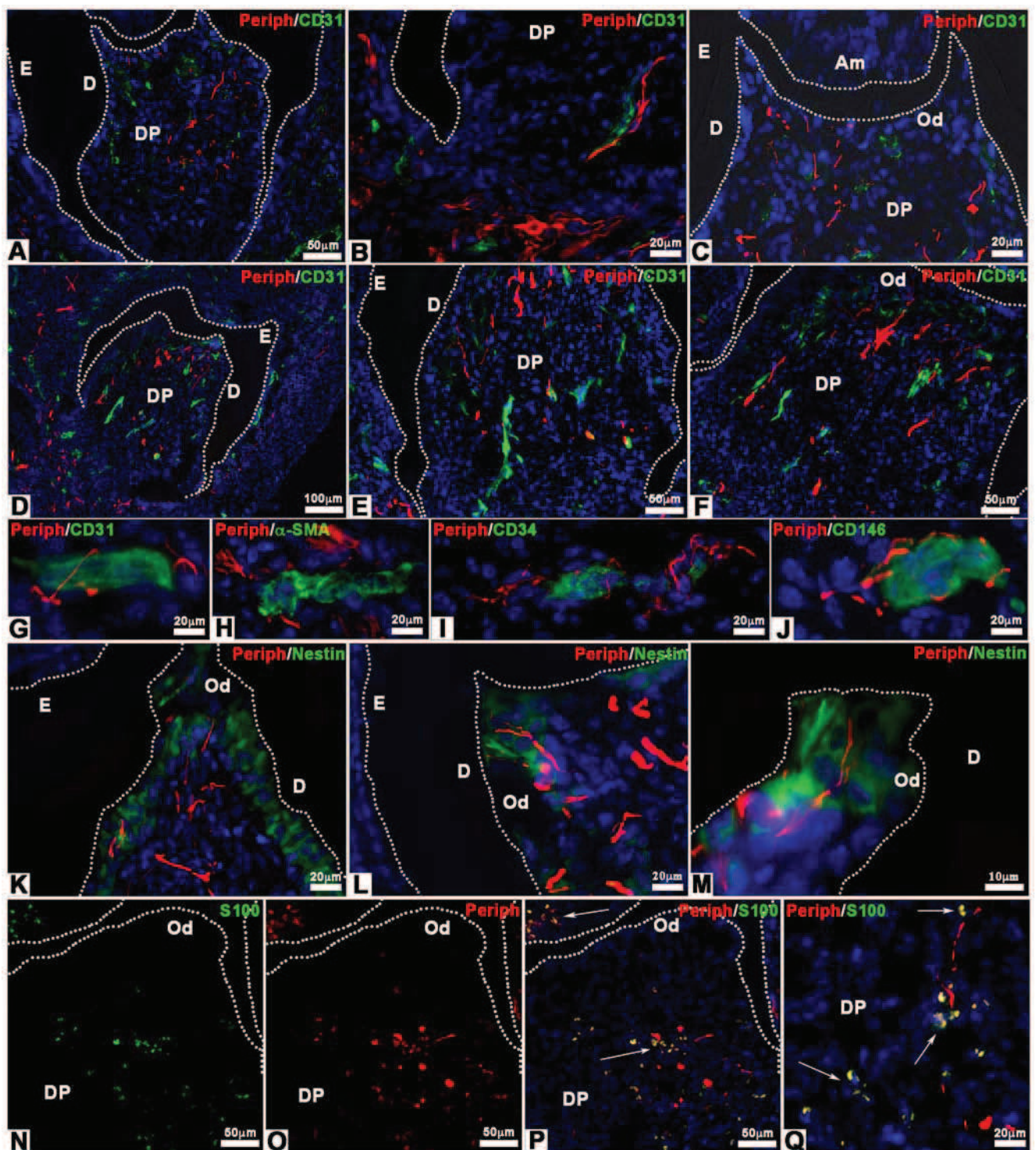
### Innervation of bioengineered teeth implanted in cyclosporin treated ICR mice

ICR mice were treated with CsA, an immunosuppressant, to check possible effects on tooth tissue innervation. Cultured re-associations were co-implanted with trigeminal ganglia for one week (41 samples) or two weeks (188 samples) under the skin of



**Figure 2. Innervation of bioengineered teeth implanted in ICR mice.** Bioengineered teeth germs were co-implanted with trigeminal ganglia in adult ICR mice (A–G) for 1 (A–C) or 2 weeks (D–G). Nerve fibers and blood vessels in dental pulp and peridental tissues of bioengineered tooth were analysed immunohistochemically by using specific antibodies for peripherin (red) and CD31 (green). Blood vessels were present in peridental tissues and could enter in the dental pulp and reach odontoblasts already after 1 week of implantation (A–C). Nerve fibers were detected in peridental tissues, in peridental mesenchyme (F) and dental pulp but never in the dental pulp after 1 week (A–C) or even 2 weeks (D–G) of implantation. D, dentin; DP, dental pulp; E, enamel; Od, odontoblasts; PDM, peridental mesenchyme; TG, trigeminal ganglia.  
doi:10.1371/journal.pone.0086011.g002





**Figure 3. Innervation of bioengineered teeth implanted in cyclosporin A-treated ICR mice.** Bioengineered teeth germs were co-implanted with trigeminal ganglia between skin and muscles behind the ears in adult CsA-treated ICR mice for 1 week (A–C) or 2 weeks (D–Q). After transplantation, bioengineered teeth were analysed immunohistochemically by antibodies for nerve fibers (peripherin, red) and blood vessels (CD31, green), which showed that nerve fibers and blood vessels entered in the dental pulp after 1 and 2 weeks (A–F). Double staining for peripherin (red) (G–J), CD31 (green) (G),  $\alpha$ -SMA (green) (H), CD34 (green) (I) and CD146 (green) (J) showed associations between nerve fibers and blood vessels in the dental pulp. After 2 weeks of implantation, odontoblasts were stained by an anti-nestin antibody (green) and nerve fibers by an anti-peripherin antibody (red) (K–M). In this case, nerve fibers reached the odontoblast layer (K–M). Immunofluorescence detection of S100 protein (green) (N, P, Q) and peripherin (red) (O, P, Q) on 2 weeks implanted bioengineered teeth showed the presence of Schwann cells and nerve fibers, respectively, in the dental pulp. The overlapping of the S100 protein and peripherin immunoreactivity appeared yellow in the merged images (P, Q). Am, ameloblast; D, dentin; DP, dental pulp; E, enamel; Od, odontoblast.

doi:10.1371/journal.pone.0086011.g003

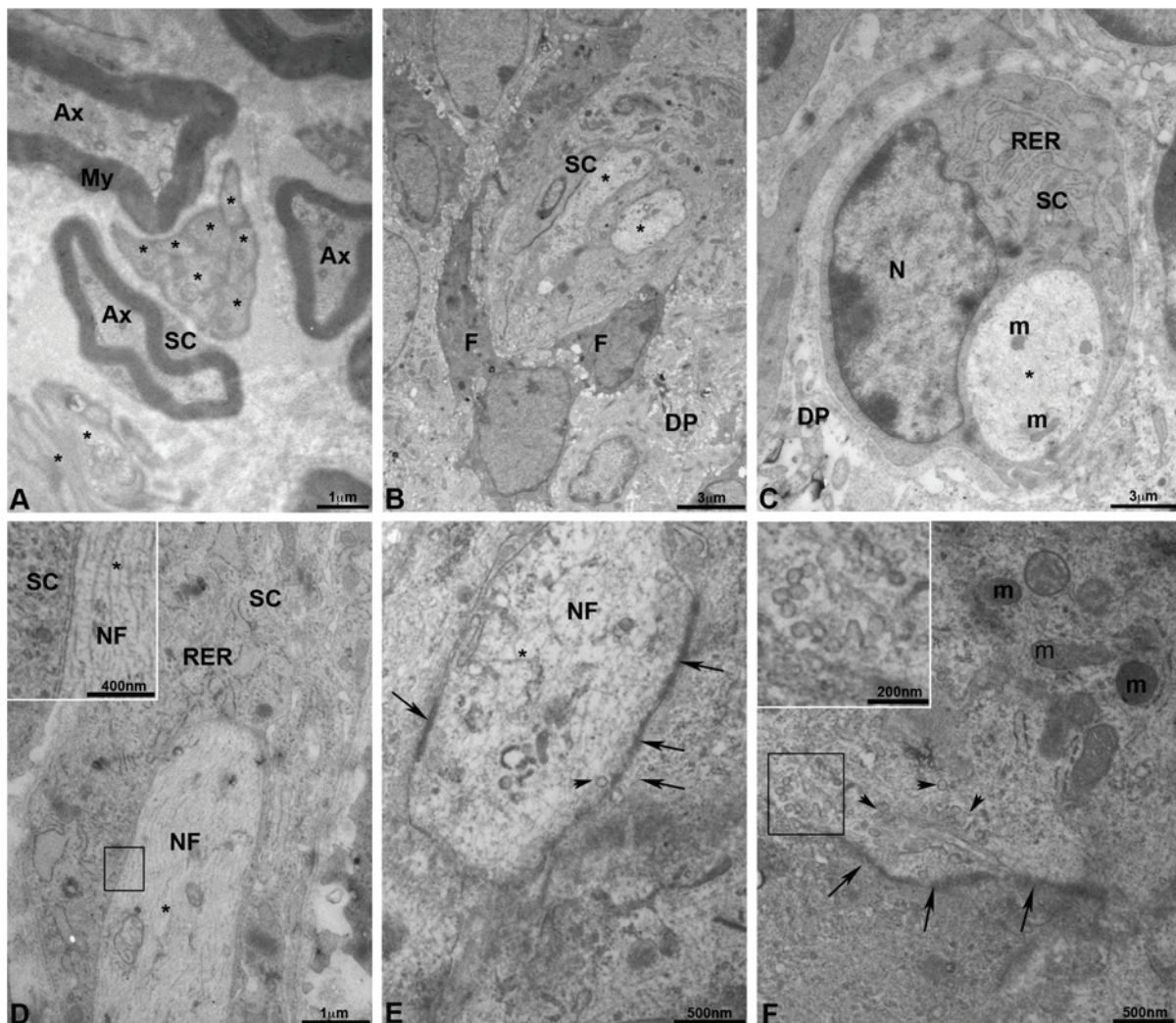


CsA-treated ICR mice (Fig. 3). After one week, nerve fibers were detected in the peridental tissues as well as in the dental pulp (Fig. 3A; 36/41 samples, 88%). Nerve fibers and blood vessels were found in close contact in the apical part of the dental pulp (Fig. 3B). Already after one week, nerve fibers and blood vessels had reached the odontoblast layer (Fig. 3C). The same situation was maintained after two weeks of implantation (Fig. 3D; 172/188 samples, 91.5%).

After two weeks, CD31, CD34 and CD146 positive blood vessels were localized all over the dental pulp (Figs. 3G, I, J), whereas  $\alpha$ -SMA positive blood vessels were localized only in the lower part of the dental pulp (Fig. 3H). Complexes between nerve fibers and blood vessels were formed with immature blood vessels, positive for CD31 (Fig. 3G) and CD34 (Fig. 3I) all over the dental mesenchyme. Nerves were also found in the vicinity of mature

blood vessels, surrounded by pericytes, which were positive for  $\alpha$ -SMA (Fig. 3H) and CD146 (Fig. 3J). Blood vessels and nerve fibers were observed in close vicinity in the apical and central part of the dental pulp (Fig. 3E).

After two weeks of implantation, nerve fibers and blood vessels were present in the odontoblast layer (Fig. 3F). Odontoblasts were characterized by immunostaining for nestin (Fig. 3K), a specific marker for differentiated odontoblasts [19,20]. Nerve fibers were present between odontoblasts and in contact with dentin (Figs. 3L, M). Double staining was performed for peripherin and S100 protein (Figs. 3N–Q), a Schwann cells marker (Fig. 3N). The merged images showed the presence of Schwann cells in the peridental tissues (Fig. 3P) and in the dental pulp (Figs. 3P, Q). Innervation of cultured cell re-associations was possible in CsA-



**Figure 4. Innervation of bioengineered teeth implanted in cyclosporin A-treated ICR mice by transmission electron microscopy.** Transmission electron microscopy (TEM) of trigeminal ganglia (A) showed the presence of myelinated and unmyelinated axons surrounded by Schwann cells (A). TEM of dental pulp of epithelial and mesenchymal cell-cell re-associations co-implanted for 2 weeks with trigeminal ganglia in CsA-treated ICR mice showed the presence of unmyelinated axons (B). These axons were surrounded by a Schwann cell and located near fibroblasts, which secreted collagen (B). In C, one unmyelinated axon was surrounded by a Schwann cell with a developed rough endoplasmic reticulum. Neurofilaments (D, E), numerous secretory vesicles (arrowheads in F and insert) and mitochondria (F) were present in the axons. A typical structure of a pre-synapse with numerous mitochondria and synaptic vesicles (arrowheads) was observed (F). Thickening of the membrane suggested presence of synaptic contacts (arrows in E and F). Ax, myelinated axon; DP, dental pulp; F, fibroblasts; m, mitochondria; N, nucleus; NF, neurofilaments; My, myelin; RER, rough endoplasmic reticulum; SC, Schwann cells; \*, unmyelinated axon.

doi:10.1371/journal.pone.0086011.g004



treated ICR mice when co-implanted with trigeminal ganglia of newborn ICR mice.

### Innervation of bioengineered teeth implanted in CsA-treated ICR mice by transmission electron microscopy

Myelinated and unmyelinated axons, separated by a collagen-rich extracellular matrix, were present in trigeminal ganglia. This result was also observed after two weeks of co-implantation with dental cell re-associations (Fig. 4A). Myelinating Schwann cells formed a compact multilayered sheath around large diameter axons (Fig. 4A) and non-myelinating Schwann cells ensheated several axons of smaller diameter (Fig. 4A). In the pulp of teeth coming from implanted cell re-associations in CsA-treated ICR mice, only unmyelinated axons were detected (Figs. 4B–F). Schwann cells (Figs. 4B–D) showed a developed rough endoplasmic reticulum (Figs. 4C, D). In axons, neurofilaments (Figs. 4D and insert, 4E), mitochondria (Figs. 4C, F) and synaptic vesicles (Figs. 4E, F) were observed by TEM. Thickenings of the plasma membrane suggested presence of synaptic contacts (Figs. 4E, F).

### Bioengineered teeth implanted for two weeks in CsA-treated ICR mice: morphological data

The status of cell re-associations implanted for two weeks under the skin in CsA-treated mice was analyzed by histology (Fig. 5) and transmission electron microscopy (Fig. 6). As well as in untreated ICR mice [2], teeth developed, showing a well formed crown (Fig. 5A) and the initiation of root formation (Figs. 5A, F, G, H, I). Blood vessels were observed in the apical and central part of the dental pulp and reached the odontoblasts (Figs. 5A, B). Odontoblasts were elongated and showed a cytological polarization, as evidenced by the position of the nucleus, opposite to the secretory pole (Figs. 5B, 6A) and the localization of the rough endoplasmic

reticulum (Fig. 6C). Different types of junctions between odontoblasts were observed including desmosomes (Fig. 6B and insert) and zonula adherens (Fig. 6C and insert). Odontoblasts also showed functional differentiation: development of the rough endoplasmic reticulum (Fig. 6C), presence of secretory granules (Arrowheads Fig. 6C), and polarized secretion of predentin/dentin (Figs. 5B, 6G). The mineralization of dentin occurred normally (Figs. 5A, 5B; 6G and insert, 6H). Numerous odontoblast cell processes were observed in predentin and dentin (Figs. 5B, 5E; 6D). Dentinal tubules in predentin/dentin reached dentin-enamel junction (Fig. 5E).

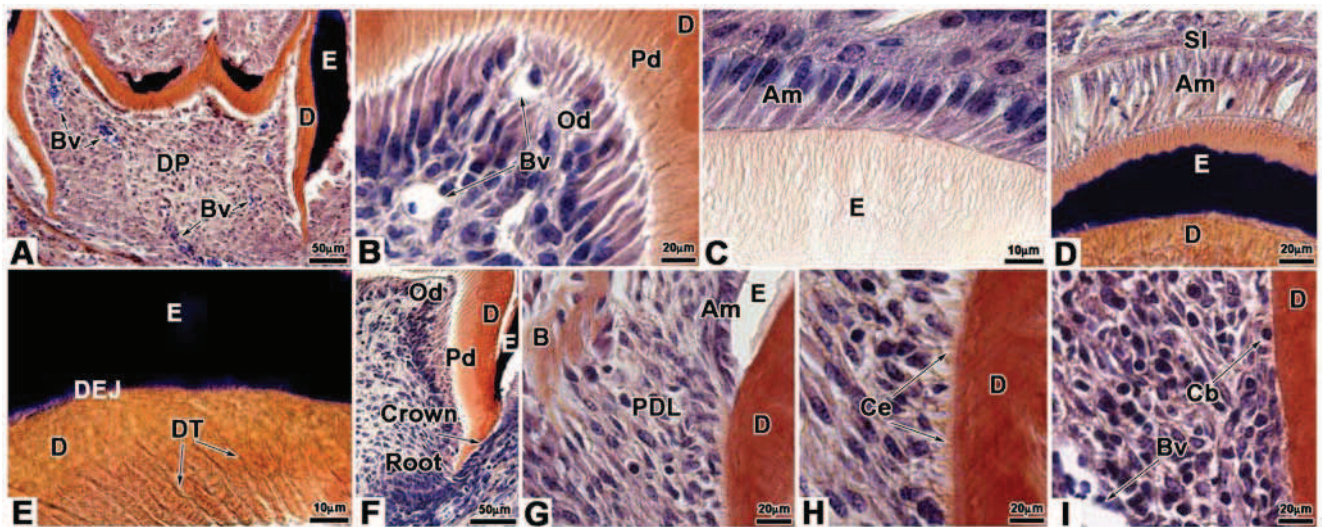
Ameloblasts were elongated, polarized (nuclei distant from the secretory pole) and functional with deposition of enamel (Figs. 5C, 5D, 6E). They were also in contact with flat cells of the stratum intermedium (Fig. 5D). Many coated vesicles were present at the secretory pole of ameloblasts (Fig. 6F and insert) suggesting a locally active re-internalization process. The enamel showed a typical crystal organization (Fig. 6H and insert).

Cementoblasts secreted the cementum on the external surface of root dentin, which allowed periodontal ligament cells to anchor in this matrix (Figs. 5H, G). These cells extended towards newly formed bone (Fig. 5F).

The development of teeth which formed after two weeks of implantation under the skin in CsA-treated ICR mice did not show any differences with those forming after implantation in ICR mice [2].

### Innervation of bioengineered teeth implanted in Nude mice

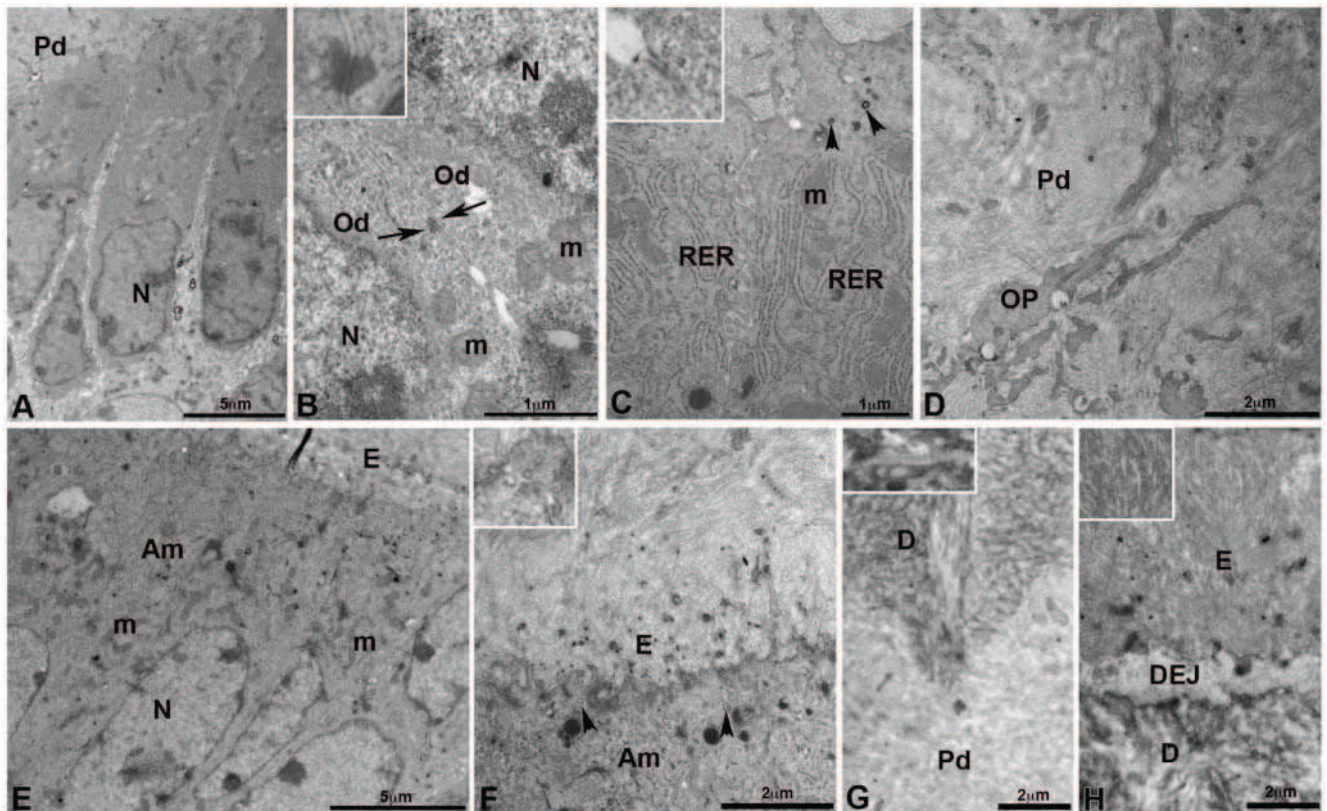
Similar experiments have been performed in Nude mice: 98 re-associations with trigeminal ganglia and 28 re-associations without trigeminal ganglia have been implanted. In these conditions, nerve



**Figure 5. Histology of bioengineered teeth implanted for 2 weeks in cyclosporin A-treated ICR mice.** Bioengineered teeth implanted for 2 weeks under the skin in CsA-treated ICR mice were analysed by histology. Crown development was identical to that observed for Nude mice (A). Blood vessels could enter in the dental pulp (A), migrated in the pulp (A) and reached odontoblasts (B). Odontoblasts were elongated and polarized by the position of the nucleus, opposite to the secretory pole (B). Thus the secretion of predentin/dentin was polarized (B). As well as to Nude mice, ameloblasts of bioengineered teeth implanted in CsA-treated ICR mice, were elongated, polarized and secreted enamel (C). In contact with ameloblasts stratum intermedium could be observed (D). In the predentin/dentin, dentinal tubules were present and reached the dentin-enamel junction (E). After 2 weeks of implantation, root was developed (F) and newly formed bone was present in dental mesenchyme (G) as well as in Nude mice. In contact with the external surface of dentin, cementoblasts were observed (I). These cells were functional and deposited cementum (H). Periodontal ligament was attached to the root by cementum and extended until reaching newly formed bone (G, H). Am, ameloblast; B, bone; Bv, blood vessel; Cb, cementoblast; Ce, cementum; D, dentin; DEJ, dentin-enamel junction; DP, dental pulp; DT, dentinal tubule; E, enamel; Od, odontoblast; Pd, predentin; PDL, periodontal ligament; SI, stratum intermedium.

doi:10.1371/journal.pone.0086011.g005





**Figure 6. Transmission electronic microscopy of bioengineered teeth implanted for 2 weeks in cyclosporin A-treated ICR mice.** Odontoblasts, dentinogenesis (A–D, G) and ameloblasts-enamel (E, F, H) in bioengineered teeth implanted for 2 weeks in CsA-treated ICR mice were analysed by transmission electron microscopy. Elongated odontoblasts showed a polarized position of the nucleus (A). A desmosome was observed between two odontoblasts (B: arrows and insert). In the cytoplasm of odontoblasts, the rough endoplasmic reticulum, mitochondria and secretory vesicles (arrowheads) were present in the supra-nuclear area (C). The insert in C showed a zonula adherens between two odontoblasts. Odontoblast processes were surrounded by collagen fibers from predentin (D). Ameloblasts were elongated and their nuclei were distant from the secretory pole (E), which contained numerous vesicles (F, arrowheads and insert). The junction between predentin and mineralized dentin was clearly visible (G). The insert in G showed the typical periodic striation of collagen fibers. The dental-enamel junction showed typical organization of enamel (E and insert) and dentin (H). Am, ameloblast; D, dentin; DEJ, dentin-enamel junction; E, enamel; Od, odontoblast; m, mitochondria; N, nucleus; OP, odontoblast processes; Pd, predentin; RER, rough endoplasmic reticulum.  
doi:10.1371/journal.pone.0086011.g006

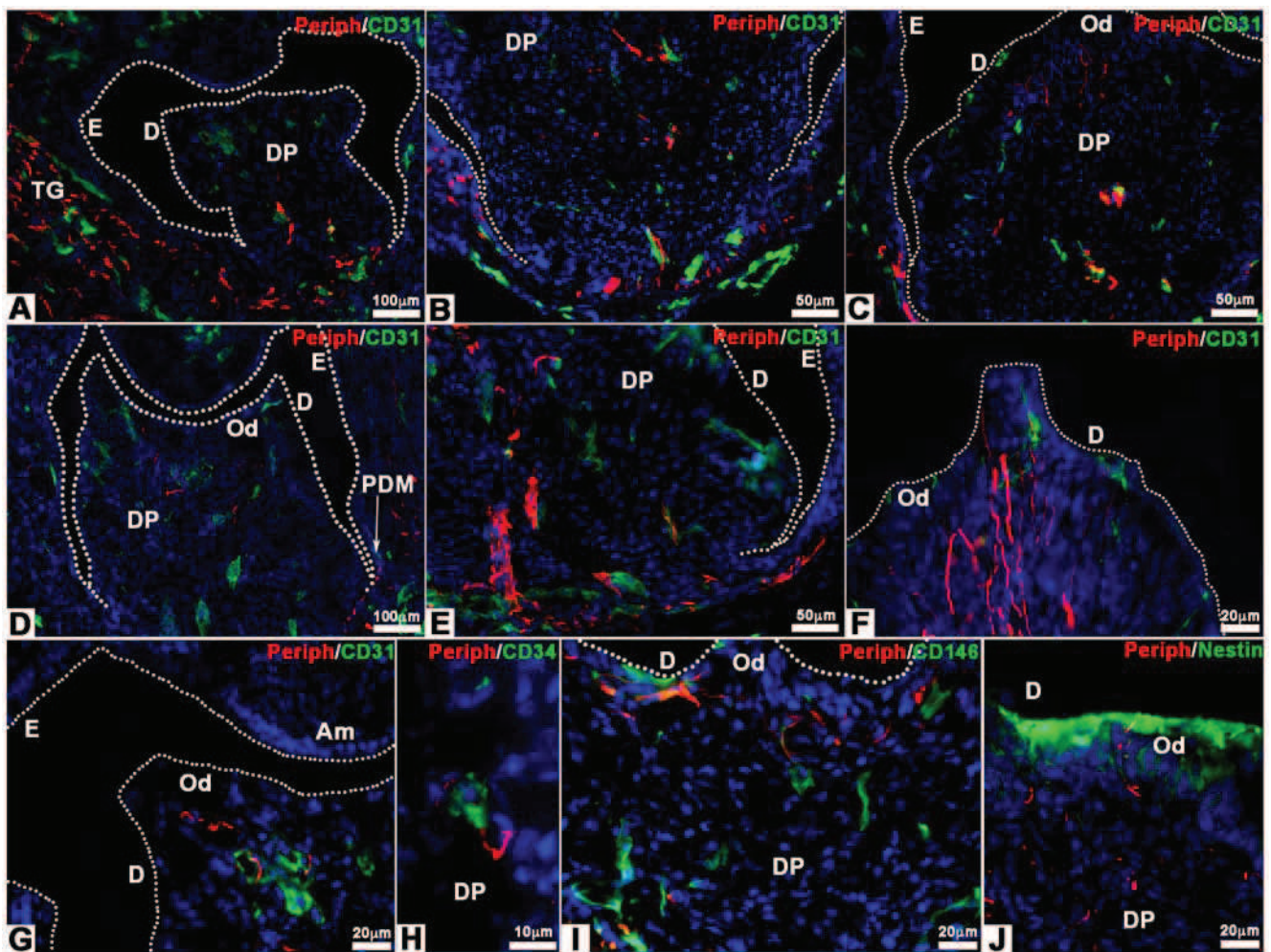
fibers were present in the mesenchyme around the tooth and also entered the dental pulp (Figs. 7A–F). This was already detected already after one week of implantation (Figs. 7A–C). The presence of nerve fibers in the dental mesenchyme was observed in almost 87% of the re-associations ( $n = 33/38$  samples) after one week and this proportion were maintained after two weeks (90%,  $n = 54/60$  samples). After one week of implantation, nerve fibers were observed in close contact with blood vessels in both the apical (Fig. 7B) and central (Fig. 7B) parts of the dental pulp. However, nerve fibers had reached the basal pole of odontoblasts (Fig. 7C). After two weeks, the nerve fibers in the dental mesenchyme (Figs. 7D, E) had extended to reach odontoblasts (Fig. 7F). After two weeks, CD31, CD34 and CD146 positive blood vessels were localized all over the dental pulp (Figs. 7G, H, I). Complexes between nerve fibers and immature blood vessels were detected after staining for CD31 (Fig. 7G) and CD34 (Fig. 7H) all over the dental mesenchyme. Nerves were also found in the vicinity of mature blood vessels positive for CD146 (Fig. 7I). After two weeks of implantation, nerve fibers and blood vessels were present in the odontoblast layer (Figs. 7F, G, I, J). Odontoblasts were characterized by immunostaining for nestin (Fig. 7J). Nerve fibers were present between odontoblasts and in contact with dentin (Figs. 7F, J). In the absence of trigeminal ganglia, the implantation of cell re-

associations under the skin of Nude mice did not allow a spontaneous innervation of the implants (0/28 samples).

#### Histology of bioengineered teeth implanted for two weeks in Nude mice

Histology was performed to analyze the development of cultured cell re-associations implanted for two weeks in Nude mice and was compared it to implantations performed in ICR mice [2] and CsA-treated ICR mice (Fig. 5). After two weeks of implantation in Nude mice (Fig. 8), the crown was well formed (Fig. 8A). Odontoblasts were elongated and polarized: their nuclei showed an excentric position, opposite to the secretory pole (Figs. 8B, C). Odontoblasts were engaged in a functional differentiation by secreting predentin/dentin (Fig. 8B). Dentinal tubules were observed in predentin/dentin and extended toward the dentin-enamel junction (Fig. 8H). The presence of predentin/dentin allowed the induction of ameloblast cytological and functional differentiation (Fig. 8D). Ameloblasts were also elongated, polarized, and secreted enamel (Fig. 8D). In contact with ameloblasts, flatten cells formed the stratum intermedium (Fig. 8D). Blood vessels were observed, in contact with the stratum intermedium (Fig. 8D). Next to the crown-root junction, elongated mesenchymal cells were in contact with the acellular cementum on





**Figure 7. Innervation of bioengineered teeth implanted in Nude mice.** Bioengineered teeth germs were co-implanted with trigeminal ganglia in adult Nude mice (A–J) for 1 (A–C) or 2 weeks (D–J). Nerve fibers and blood vessels in dental pulp and peridental tissues of bioengineered teeth were analysed immunohistochemically by using specific antibodies for peripherin and CD31. Blood vessels were present in peridental tissues and could enter in the dental pulp and reach odontoblasts already after 1 week of implantation (A–C). The staining for peripherin showed that nerve fibers entered in the dental pulp (A, D) and extend in the pulp (B, E) after 1 (A–C) and 2 (D–J) weeks. After 1 week of implantation, nerve fibers did not reach the odontoblasts (C). This was achieved only after 2 weeks of implantation (F, G, I, J). Double staining for peripherin (G–I), CD31 (G), CD34 (H) and CD146 (I) showed associations between nerve fibers and blood vessels in the dental pulp (H) and subodontoblastic layer (G, I). After 2 weeks of implantation, nerve fibers, visualized by anti-peripherin antibody, had reached the odontoblast (positive for nestin) layer (J). Am, ameloblasts; D, dentin; DP, dental pulp; E, enamel; Od, odontoblasts; PDM, peridental mesenchyme; TG, trigeminal ganglia. doi:10.1371/journal.pone.0086011.g007

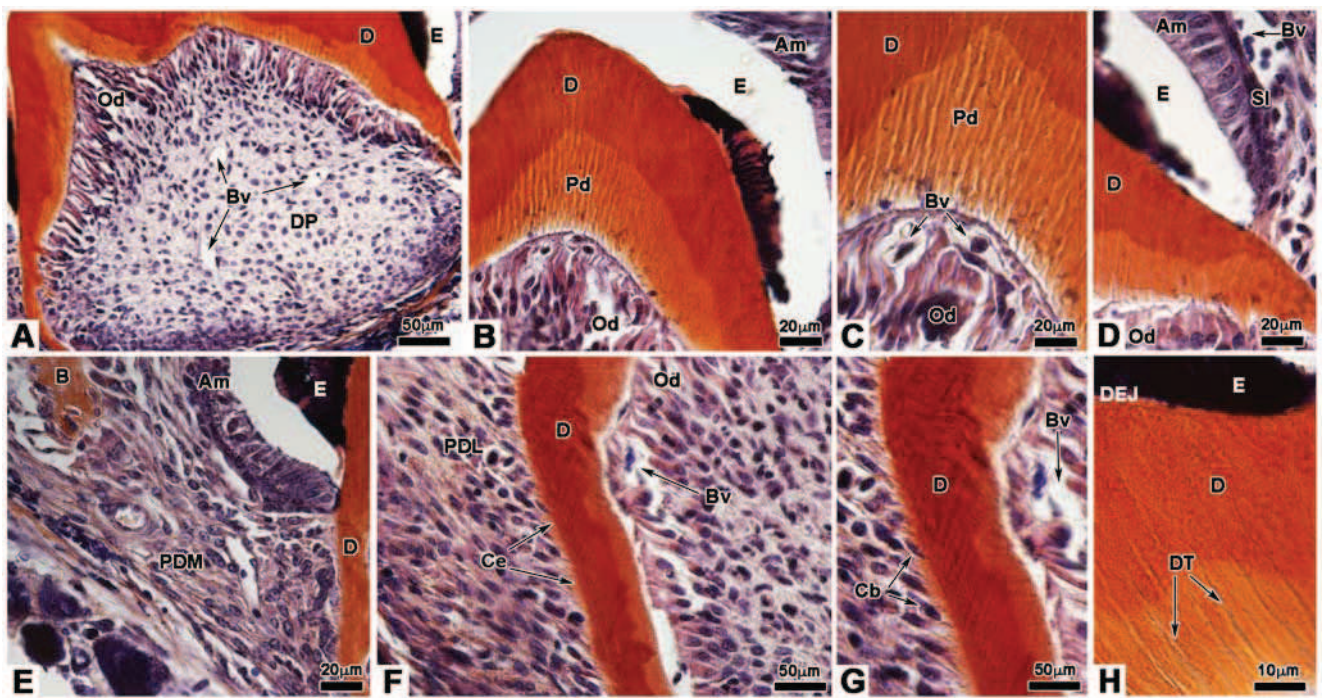
the root surface (Figs. 8F, G). These cells, corresponding to the principal periodontal ligament fibroblasts, extended towards newly formed bone (Fig. 8E). In the root, blood vessels were observed in close contact with functional odontoblasts (Figs. 8F, G). In contact with the external surface of root dentin, the cementum was secreted by the cementoblasts (Figs. 8F, G). The different steps of odontogenesis could take place and showed the same timing as observed after implantation in ICR mice and CsA-treated ICR mice (Fig. 5).

## Discussion

Previously published data have reported the innervation of engineered teeth after implantation in the jaw of adult mice [21]. However, and despite repeated attempts ( $n=42$ ), we could not observe any spontaneous innervation of the dental mesenchyme from cultured re-associations after implantation under the skin of adult ICR mice, thus confirming previous preliminary experi-

ments [1]. The origin of the dental embryonic cells, the developmental stage of the teeth from which cells were prepared, and the methodology used to engineer teeth were very similar in the experiments performed in the two laboratories [17,22–24]. Since the implantation under the skin, instead of jaw, might bring a limitation in the possibility of innervation, cell re-associations were implanted together with trigeminal ganglion, which mediates the sensory innervation of teeth and periodontal tissues in the lower jaw in physiological conditions [25]. In these conditions, neural growth was regularly observed extending from the trigeminal ganglion to all around the forming teeth. Although nerve growth did occur, the innervation of the dental mesenchyme was detected in less than 2.5% of samples ( $n=152$ ). There was a specific impairment of axons to enter the dental mesenchyme although, after two weeks of implantation, a thick layer of enamel has been deposited and axons should be able to reach odontoblasts [10]. After two weeks of implantation, the cell re-associations





**Figure 8. Histology of bioengineered teeth implanted for 2 weeks in Nude mice.** After 2 weeks transplantation under the skin in Nude mice, bioengineered teeth germs were analysed by histology. The crown was well developed and blood vessels entered in the dental pulp (A). Odontoblasts and ameloblasts became functional to secrete predentin/dentin and enamel respectively (B). Odontoblasts were elongated and polarized (C). Blood vessels migrated in the dental pulp and reached odontoblasts (C). Elongated and polarized ameloblasts formed a monolayer in contact with the stratum intermedium where blood vessels could be found (D). In the dentin, dentinal tubules extended toward the dentin-enamel junction (H). Newly formed bone was present in peridental mesenchyme (E). Below the crown-root junction, periodontal ligament were attached to the root by cementum and extended until reaching bone (F), as shown in (E). Cementoblasts were observed in contact with the external surface of dentin (G) and secreted the cementum (F). Am, ameloblast; B, bone; Bv, blood vessel; Cb, cementoblast; Ce, cementum; D, dentin; DEJ, dentin-enamel junction; DP, dental pulp; DT, dentinal tubule; E, enamel; Od, odontoblast; Pd, predentin; PDL, periodontal ligament; PDM, peridental mesenchyme; SI, stratum intermedium.  
doi:10.1371/journal.pone.0086011.g008

reach a stage corresponding to a first lower molar at PN4 when taking into account the crown development and stage of matrix deposition and mineralization [2,26]. At PN4, axons can be detected in the dental pulp (Figs. S1D–G).

Previous works concerning face transplantation in human had shown that immunosuppressive therapy supported an unexpected reinnervation of the transplanted tissues [14]. Experimentally, the motor and sensory innervation of midface allotransplantation could be achieved in CsA-treated rats [27]. Cultured cell re-associations were thus implanted in ICR mice treated with CsA as an immunosuppressant. In these conditions, nerve fibers were detected in dental pulp already after one week. At this stage, nerves were even found to reach the odontoblast layer, which would correspond to PN7 *in vivo* (Figs. S1H–L). After two weeks, axons were present between odontoblasts and in contact with dentin, which would correspond to the physiological situation at PN10 (Figs. S1M–Q). Although only unmyelinated axons were detected, Schwann cells were present in both the peridental and dental mesenchymes of bioengineered teeth implanted in CsA-treated ICR mice. In physiological conditions, both myelinated and unmyelinated axons have been observed in the dental pulp of rodent molar [28].

Besides immunosuppression, CsA has been reported to interfere with growth cone activity, by stimulating their attraction [29]. Although these specific structures have not been searched for in implanted cell re-associations, growth cones have been described in the developing teeth in rodents [30,31]. Other studies have

shown that CsA stimulated axonal growth and induced GAP-43 expression [32]. Most dental axons express GAP-43 [33,34]. Here may lay the main difference between our past experiments, where cell re-associations were implanted under the skin of adult untreated ICR mice [1], and those from the group of Tsuji, where cells re-associations have been transiently implanted in the kidney capsule using a CsA-treated mice [24], and then in the jaw of adult mice [21,24]. However, these authors did not specify whether or not CsA-treatment was maintained during the implantation in the jaw [21]. Nevertheless, since CsA shows multiple effects (Fig. S2) [29,32–39], including on T cells activity (Fig. S2A) and proliferation (Fig. S2A, B), as well as direct ones on nerve growth (Fig. S2C), attempts were made to check whether immunosuppression by itself could interfere with the innervation. To evaluate it, cell re-associations and trigeminal ganglia were co-implanted in immunodeficient Nude mice. In these conditions as well, the innervation of the dental mesenchyme was observed already after one week of implantation and axons reached the odontoblast layer after two weeks. The percentages of samples innervated after implantation in CsA-treated ICR and Nude mice were similar. This clearly showed that immunosuppression *per se* can interfere with and is sufficient to stimulate the innervation of the dental mesenchyme. Supportive data have recently been published, although in a very different experimental context. Indeed, the autologous transplantation of pulp stem cells with granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF) in pulpectomized tooth was found to stimulate the regeneration of pulp tissue,

including vascularization and innervation [40]. According to these authors, G-CSF together with conditioned medium of pulp stem cells, which stimulated cell migration and neurite outgrowth, also promoted immunosuppression *in vitro* [40]. Since in a clinical context, immunosuppressant therapy is a deep constraint and carries own risks, the possibility to use it temporarily only will have to be investigated [41].

Histological analysis and transmission electron microscopy were performed to ensure that the development of implanted cell re-associations in Nude mice or CsA-treated ICR mice did not show any alteration, when compared with re-associations implanted in control ICR mice [2]. Indeed, tooth crown morphogenesis, epithelial histogenesis and functional cell differentiation in both the crown and root areas progressed in a very similar way in all three models. After two weeks of implantation, odontoblasts were functional and accumulated predentin and dentin with characteristic organization as seen by transmission electron microscopy. Ameloblasts were polarized, secreted enamel, suggesting that the transport of calcium ions involved in enamel mineralization occurred normally. After two weeks of implantation, most ameloblasts already appeared as short cells with few rough endoplasmic reticulum cisternae, suggesting that they had already reached their maturation stage [42]. This reflected what happens during amelogenesis in mouse molars during development *ex vivo* and also when cell re-associations were implanted for two weeks in ICR mice without trigeminal ganglia [2]. The same was observed after co-implantation in ICR mice, Nude mice as well as in CsA-treated ICR mice. It is important to stress that when co-implantation was performed in CsA-treated mice, both the cytological and functional polarization of odontoblast and ameloblast did occur. All three constituents of the cytoskeleton (microtubules, microfilaments and intermediate filaments) are involved in these steps. CsA thus had no negative effect, although it is a specific inhibitor of the calcineurin-NFAT pathway [35]. Indeed, calcineurin is known to regulate the organization of the cytoskeleton [43]. On the other hand, calcineurin is strongly expressed in secretory odontoblasts and ameloblasts, where it was suggested to correlate with active mineralization phases [44]. Histology and transmission electron microscopy showed that there was no alteration in dentin and enamel secretion and mineralization when cell re-associations were implanted in CsA-treated ICR mice, instead of untreated ICR mice [2].

The results presented here show that the innervation of the dental mesenchyme, including the odontoblast layer, can be achieved in implanted re-associations of embryonic dental cells. However, this does not take place spontaneously but requires immunosuppressive conditions. It will then be important to check whether the different cellular partners of the network mediating sensory function as observed by Farahani et al. [9] in the human dental pulp can be found in implanted cell re-associations as they may exist in the mouse molar mesenchyme. Previous analysis of the cell heterogeneity in the dental mesenchyme of cultured and implanted re-associations showed that it can mimic the situation in the mouse first lower molars *in vivo* [26]. However, the different glial cell types and their network in implanted re-associations have not been investigated yet.

## Supporting Information

**Figure S1 Innervation of the dental mesenchyme of the first lower molar in ICR mice.** First lower molars from ICR mice at Postnatal (PN) days 3 (A–C), 4 (D–G), 7 (H–L) and 10 (M–Q) were analysed immunohistochemically for checking nerves development in the dental pulp. The goal was to have controls

allowing comparison with the innervation as observed in experimental conditions, when cultured cell-reassociations were co-implanted with trigeminal ganglia. Nerve fibers (red staining) were visualized using an antibody directed against peripherin (A–Q) and relationships with blood vessels (green staining) using antibodies against CD31 (A, B, H, I, M), CD34 (B, E, K, P) and CD146 (C, F, G, L, Q). At PN3 (A–C), the innervation of the dental pulp just started in its apical part (A–C). Inserts, as magnification of boxes in A and C respectively, showed associations between nerve fibers and CD31 positive or CD146 positive blood vessels in the apical part of the dental pulp. However, such interactions could not found with CD34 positive blood vessels (insert in B). At PN4 (D–G), nerve fibers had reached the central part of the dental pulp. Magnifications of boxed areas in inserts showed associations between nerve fibers and CD31 (D) or CD34 (E) positive blood vessels respectively. At this stage, nerve fibers were also associated with CD146 positive blood vessels (G). At PN7 (H–L), nerve fibers reached the basal pole of odontoblasts, characterized by their positive staining for nestin (J). High magnifications from inserts in H, K and L showed associations between nerve fibers and CD31, CD34 and CD146 positive blood vessels in the central part of dental pulp. For CD31 positive blood vessels associations with nerve fibers were observed in the apical part of dental pulp (I). At PN10 (M–Q), nerve fibers were present in between odontoblasts (O) and peripherin was even detected in the dentinal tubules (N). Associations between nerve fibers and CD31 positive blood vessels were observed in different parts of the dental pulp (M), even very close from the odontoblast layer (boxed area and its magnification in insert in M). Boxed areas and magnifications in inserts in P and Q showed associations between nerve fibers and CD34 (P) and CD146 (Q) positive blood vessels in the dental pulp. Av, alveolar nerve; Bv, blood vessel; D, dentin; DP, dental pulp; Od, odontoblasts. (TIF)

## Figure S2 Mechanisms of action of cyclosporin A (CsA).

Three different mechanisms have been proposed in the literature (A, B, C). (A) In the cytoplasm of T cells, CsA binds to cyclophilin (CpN) to form a complex. This complex binds and blocks the function of the enzyme calcineurin (CaN). Consequently, T cells do not produce some cytokines, which were necessary for full T cell activation. Furthermore, this pathway inhibits the proliferation of T cells. (B) Alternatively, CsA may increase transforming growth factor-beta1 (TGF-β1) transcription in interleukin-2 dependent T cells. This pathway also induces the inhibition of proliferation of T cells. In both cases (A, B), the inhibition of T cells enhances axonal regeneration. (C) CsA increases the expression of growth associated protein-43 (GAP-43) expression in axonal growth cones and thus may have a direct effect on axonal extension. IL, interleukin; IFN-γ, interferon-gamma; GM-CSF, granulocyte macrophage-colony stimulating factor.

(TIF)

## Acknowledgments

The authors thank Prof. Henry Magloire for helpful suggestions to conduct this study, Prof. Jean-Christophe Maurin for help with trigeminal ganglia dissection, Dr N. Messaddeq for her help for TEM observations and Hervé Gegout for the histology.

## Author Contributions

Conceived and designed the experiments: HL JLW SKB TB LK TK. Performed the experiments: HL SKB TB TK. Analyzed the data: HL JLW

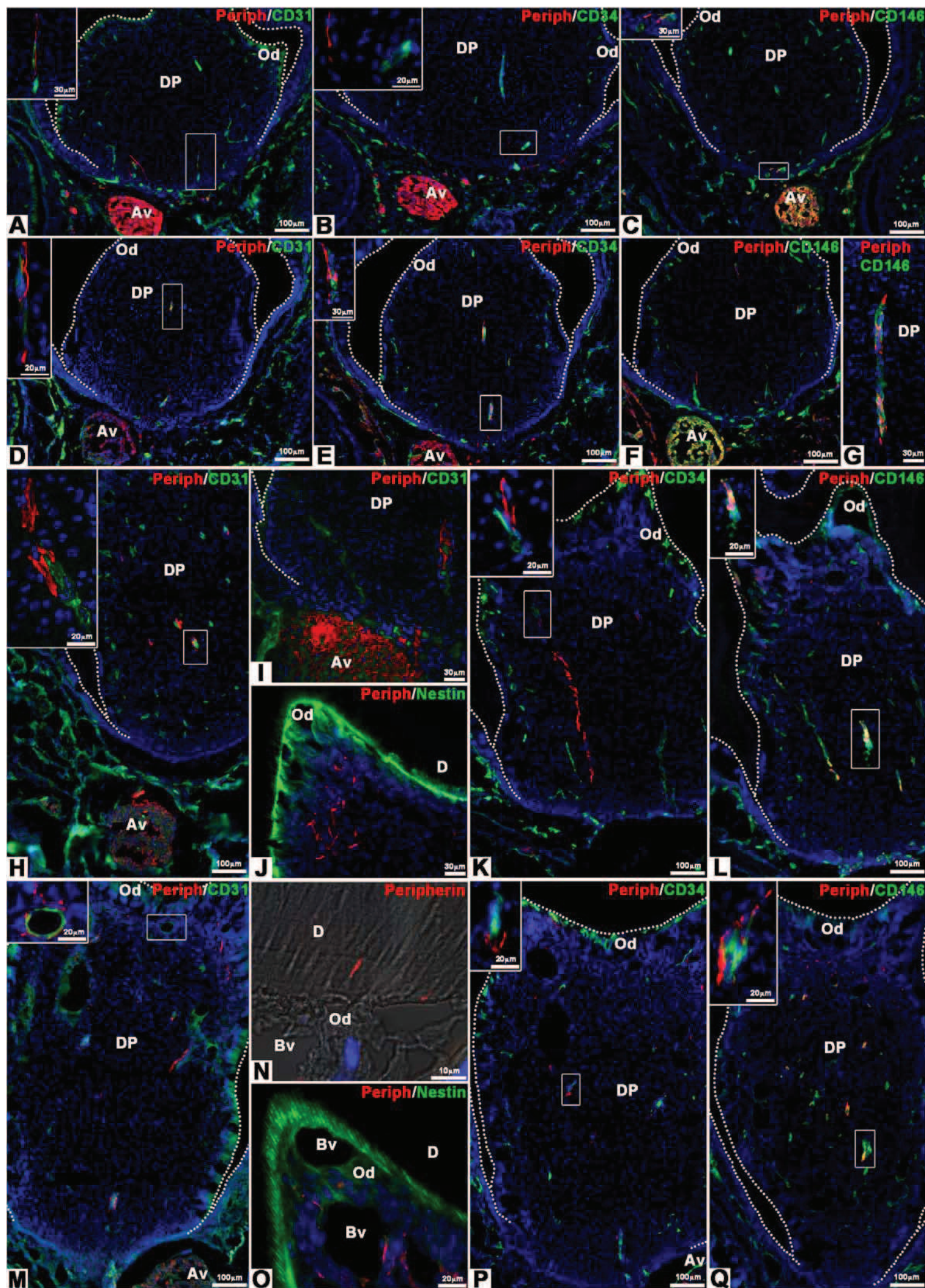


SKB TB LK TK. Contributed reagents/materials/analysis tools: SKB TB TK. Wrote the paper: HL SKB TK.

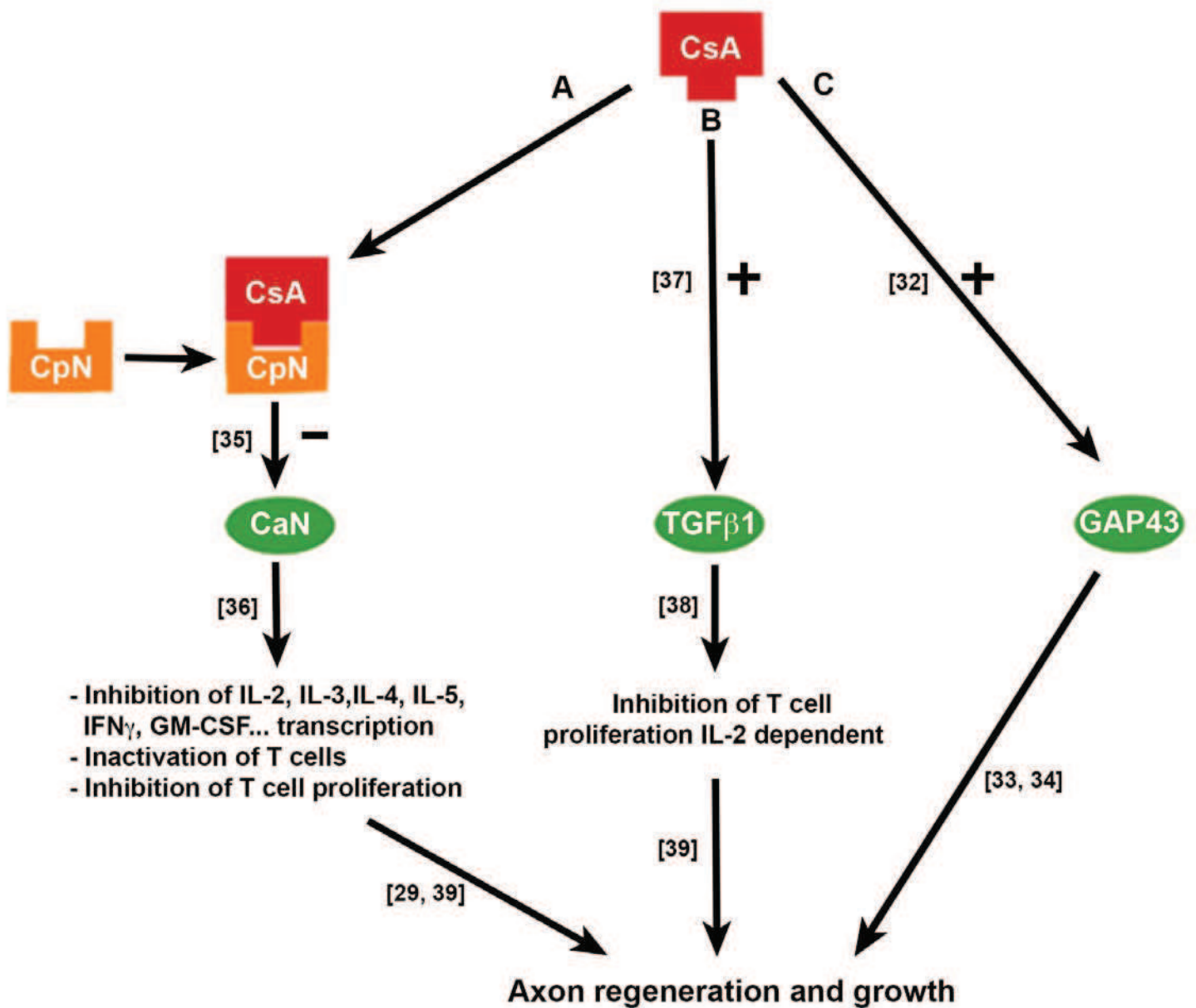
## References

- Keller L, Kuchler-Bopp S, Lesot H (2013) Whole-Tooth Engineering and Cell Sources. In: Huang GT-J, Thesleff I, editors. *Stem Cells in Craniofacial Development and Regeneration*. John Wiley & Sons, Inc. pp. 431–446. Available: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/9781118498026.ch24/summary>. Accessed 10 October 2013.
- Nait Lechguer A, Couble ML, Labert N, Kuchler-Bopp S, Keller L, et al. (2011) Cell Differentiation and Matrix Organization in Engineered Teeth. *J DENT RES* 90: 583–589. doi:10.1177/0022034510391796.
- Ohazama A, Modino SAC, Miletich I, Sharpe PT (2004) Stem-cell-based tissue engineering of murine teeth. *J Dent Res* 83: 518–522.
- Nakagawa E, Itoh T, Yoshie H, Satokata I (2009) Odontogenic potential of post-natal oral mucosal epithelium. *J Dent Res* 88: 219–223. doi:10.1177/0022034509333198.
- Takahashi C, Yoshida H, Komine A, Nakao K, Tsuji T, et al. (2010) Newly established cell lines from mouse oral epithelium regenerate teeth when combined with dental mesenchyme. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 46: 457–468. doi:10.1007/s11626-009-9265-7.
- Wang B, Li L, Du S, Liu C, Lin X, et al. (2010) Induction of human keratinocytes into enamel-secreting ameloblasts. *Dev Biol* 344: 795–799. doi:10.1016/j.ydbio.2010.05.511.
- Angelova Volponi A, Kawasaki M, Sharpe PT (2013) Adult human gingival epithelial cells as a source for whole-tooth bioengineering. *J Dent Res* 92: 329–334. doi:10.1177/0022034513481041.
- Magloire H, Maurin JC, Couble ML, Shibukawa Y, Tsumura M, et al. (2010) Topical review. Dental pain and odontoblasts: facts and hypotheses. *J Orofac Pain* 24: 335–349.
- Farahani RM, Simonian M, Hunter N (2011) Blueprint of an ancestral neurosensory organ revealed in glial networks in human dental pulp. *J Comp Neurol* 519: 3306–3326. doi:10.1002/cne.22701.
- Mohamed SS, Atkinson ME (1983) A histological study of the innervation of developing mouse teeth. *J Anat* 136: 735–749.
- Lillesaar C, Fried K (2004) Neurites from trigeminal ganglion explants grown in vitro are repelled or attracted by tooth-related tissues depending on developmental stage. *Neuroscience* 125: 149–161. doi:10.1016/j.neuroscience.2004.01.008.
- Fried K, Nosrat C, Lillesaar C, Hildebrand C (2000) Molecular signaling and pulpal nerve development. *Crit Rev Oral Biol Med* 11: 318–332.
- Kettunen P, Løes S, Furmanek T, Fjeld K, Kvinnsland IH, et al. (2005) Coordination of trigeminal axon navigation and patterning with tooth organ formation: epithelial-mesenchymal interactions, and epithelial Wnt4 and Tgfbeta1 regulate semaphorin 3a expression in the dental mesenchyme. *Development* 132: 323–334. doi:10.1242/dev.01541.
- Siemionow M, Gharb BB, Rampazzo A (2011) Pathways of sensory recovery after face transplantation. *Plast Reconstr Surg* 127: 1875–1889. doi:10.1097/PRS.0b013e31820c90c3.
- Rush D (2013) The impact of calcineurin inhibitors on graft survival. *Transplant Rev (Orlando)* 27: 93–95. doi:10.1016/j.trre.2013.04.003.
- Lautermilch NJ, Spitzer NC (2000) Regulation of calcineurin by growth cone calcium waves controls neurite extension. *J Neurosci* 20: 315–325.
- Hu B, Nadiri A, Bopp-Kuchler S, Perrin-Schmitt F, Lesot H (2005) Dental Epithelial Histomorphogenesis in vitro. *J Dent Res* 84: 521–525.
- Nait Lechguer A, Kuchler-Bopp S, Hu B, Haikel Y, Lesot H (2008) Vascularization of engineered teeth. *J Dent Res* 87: 1138–1143.
- Terling C, Rass A, Mitsiadis TA, Fried K, Lendahl U, et al. (1995) Expression of the intermediate filament nestin during rodent tooth development. *Int J Dev Biol* 39: 947–956.
- Quispe-Salcedo A, Ida-Yonemochi H, Nakatomi M, Ohshima H (2012) Expression patterns of nestin and dentin sialoprotein during dentinogenesis in mice. *Biomed Res* 33: 119–132.
- Oshima M, Mizuno M, Imamura A, Ogawa M, Yasukawa M, et al. (2011) Functional tooth regeneration using a bioengineered tooth unit as a mature organ replacement regenerative therapy. *PLoS ONE* 6: e21531. doi:10.1371/journal.pone.0021531.
- Hu B, Nadiri A, Bopp-Kuchler S, Perrin-Schmitt F, Wang S, et al. (2005) Dental epithelial histo-morphogenesis in the mouse: positional information versus cell history. *Arch Oral Biol* 50: 131–136. doi:10.1016/j.archoralbio.2004.09.007.
- Hu B, Nadiri A, Kuchler-Bopp S, Perrin-Schmitt F, Peters H, et al. (2006) Tissue engineering of tooth crown, root, and periodontium. *Tissue Eng* 12: 2069–2075. doi:10.1089/ten.2006.12.2069.
- Nakao K, Morita R, Saji Y, Ishida K, Tomita Y, et al. (2007) The development of a bioengineered organ germ method. *Nat Methods* 4: 227–230. doi:10.1038/nmeth1012.
- Byers MR, Nārhi MV (1999) Dental injury models: experimental tools for understanding neuroinflammatory interactions and polymodal nociceptor functions. *Crit Rev Oral Biol Med* 10: 4–39.
- Keller L-V, Kuchler-Bopp S, Lesot H (2012) Restoring physiological cell heterogeneity in the mesenchyme during tooth engineering. *Int J Dev Biol* 56: 737–746. doi:10.1387/jfdb.120076hl.
- Zor F, Bozkurt M, Nair D, Siemionow M (2010) A new composite midface allotransplantation model with sensory and motor reinnervation. *Transpl Int* 23: 649–656. doi:10.1111/j.1432-2277.2009.01032.x.
- Qian XB, Naftel JP (1996) Effects of neonatal exposure to anti-nerve growth factor on the number and size distribution of trigeminal neurones projecting to the molar dental pulp in rats. *Arch Oral Biol* 41: 359–367.
- Wen Z, Guirland C, Ming G-L, Zheng JQ (2004) A CaMKII/calcineurin switch controls the direction of Ca(2+)-dependent growth cone guidance. *Neuron* 43: 835–846. doi:10.1016/j.neuron.2004.08.037.
- Ishizuka H, Hiura A (1992) A light and electron microscopic study on pulpal nerve fibers in the lower incisor of the mouse. *Arch Histol Cytol* 55: 167–178.
- Nakakura-Ohshima K, Maeda T, Ohshima H, Noda T, Takano Y (1995) Postnatal development of periodontal ruffini endings in rat incisors: an immunoelectron microscopic study using protein gene product 9.5 (PGP 9.5) antibody. *J Comp Neurol* 362: 551–564. doi:10.1002/cne.903620409.
- Ibarra A, Hernández E, Lomeli J, Pineda D, Buenrostro M, et al. (2007) Cyclosporin-A enhances non-functional axonal growing after complete spinal cord transection. *Brain Res* 1149: 200–209. doi:10.1016/j.brainres.2007.02.056.
- Fried K, Risling M (1992) Growth-associated protein (GAP-43)-like immunoreactivity in primary and permanent tooth pulp nerve fibers of the cat. *Brain Res* 572: 19–26.
- Byers MR, Suzuki H, Maeda T (2003) Dental neuroplasticity, neuro-pulpal interactions, and nerve regeneration. *Microsc Res Tech* 60: 503–515. doi:10.1002/jemt.10291.
- Li H, Rao A, Hogan PG (2011) Interaction of calcineurin with substrates and targeting proteins. *Trends Cell Biol* 21: 91–103. doi:10.1016/j.tcb.2010.09.011.
- Miroux C, Morales O, Ghazal K, Othman SB, De Launoit Y, et al. (2012) In vitro effects of cyclosporine A and tacrolimus on regulatory T-cell proliferation and function. *Transplantation* 94: 123–131. doi:10.1097/TP.0b013e3182590d8f.
- Shin GT, Khanna A, Ding R, Sharma VK, Lagman M, et al. (1998) In vivo expression of transforming growth factor-beta1 in humans: stimulation by cyclosporine. *Transplantation* 65: 313–318.
- Brabletz T, Pfeuffer I, Schorr E, Siebelt F, Wirth T, et al. (1993) Transforming growth factor beta and cyclosporin A inhibit the inducible activity of the interleukin-2 gene in T cells through a noncanonical octamer-binding site. *Mol Cell Biol* 13: 1155–1162.
- Pool M, Rambaldi I, Darlington PJ, Wright MC, Fournier AE, et al. (2012) Neurite outgrowth is differentially impacted by distinct immune cell subsets. *Mol Cell Neurosci* 49: 68–76. doi:10.1016/j.mcn.2011.09.004.
- Iohara K, Murakami M, Takeuchi N, Osako Y, Ito M, et al. (2013) A Novel Combinatorial Therapy With Pulp Stem Cells and Granulocyte Colony-Stimulating Factor for Total Pulp Regeneration. *Stem Cells Transl Med* 2: 818. doi:10.5966/sctm.2012-0132erratum.
- Atchabahian A, Doolabh VB, Mackinnon SE, Yu S, Hunter DA, et al. (1998) Indefinite survival of peripheral nerve allografts after temporary Cyclosporine A immunosuppression. *Restor Neurol Neurosci* 13: 129–139.
- Smith CE (1998) Cellular and chemical events during enamel maturation. *Crit Rev Oral Biol Med* 9: 128–161.
- Descasez V, Mestre E, Marquet P, Essig M (2012) Calcineurin regulation of cytoskeleton organization: a new paradigm to analyse the effects of calcineurin inhibitors on the kidney. *J Cell Mol Med* 16: 218–227. doi:10.1111/j.1582-4934.2011.01398.x.
- Oshima S, Watanabe M (2012) Elevated expression of calcineurin subunits during active mineralization of developing mouse molar teeth. *Eur J Oral Sci* 120: 386–394. doi:10.1111/j.1600-0722.2012.00987.x.









### **Chapitre 3 :**

#### **Relations cellulaires au cours de l'innervation des dents obtenues par ingénierie tissulaire.**

**Kökten T.**, Lesot H. and Kuchler-Bopp S (in press). Experimental Design for the Innervation of Tooth Forming from Implanted Cell Re-associations. *In In Tech : Regenerative Medicine and Tissue Engineering*", ISBN 978-953-51-4114-3, (In press : Accepted 24.09.2014).

## **Objectifs :**

### **▪ Mise en évidence de relations cellulaires**

Nous avons vu que dans un contexte immunodépressif, l'implantation des réassociations cellulaires cultivées permet la vascularisation et l'innervation des mésenchymes péri-dentaire et dentaire (voir chapitre 2 : Kökten et al., 2014). L'innervation de la dent est particulièrement importante pour la perception des stimuli externes (mécaniques, thermiques, électriques et osmotiques) au niveau de la couronne. Cependant, hormis la fonction sensorielle, les fibres nerveuses participent à la régulation du flux sanguin, de l'inflammation dentaire et à l'homéostasie pulpaire (Olgart, 1996; Byers and Närhi, 1999; Byers et al., 2003). Pour assurer ces fonctions, les axones établissent des relations avec diverses cellules (cellules vasculaires et cellules gliales) (M. Hanani et al., 2002; Lok et al., 2007; Hamilton et al., 2010). Par ailleurs, des relations s'établissent également entre les axones et les odontoblastes pour former des complexes mécano-sensorielles (Magloire et al., 2009; 2010). En effet, l'hypothèse que les odontoblastes soient des cellules sensorielles a été émise depuis longtemps et renforcée par des études récentes (Brännström, 1966; Magloire et al., 2003; Allard et al., 2006). Ces cellules sont impliquées dans la perception des événements survenant au sein de la dentine *via* des canaux mécano-sensibles présents sur leur membrane et la transmission des signaux sensoriels aux axones par un mécanisme encore inconnu (Magloire et al., 2010). Ces différentes relations cellulaires ont été étudiées pour la pulpe dentaire chez l'homme (Magloire et al., 2010; Farahani et al., 2011). Cependant, aucune étude n'a été réalisée pour les dents obtenues par ingénierie dentaire. Dans ce but, nous avons étudié les relations qui s'établissent entre les axones et diverses cellules au niveau du mésenchyme péri-dentaire, de la pulpe dentaire et des odontoblastes. Par ailleurs, après deux semaines d'implantation l'innervation de nos implants étant similaire à celle d'une molaire physiologique à PN7 (Kökten et al., 2014), nous avons comparé nos résultats à ceux obtenus pour la dent à PN7.

### **▪ Tentative d'immuno-modulation par les cellules souches**

Les effets multiples de la Cyclosporine A (CsA) (Kökten et al., 2014) et l'incompatibilité du modèle Nude avec un contexte clinique, nous a amené à étudier une autre alternative pour obtenir l'immuno-modulation nécessaire à l'innervation de nos implants. Il a été montré que les cellules souches facilitent l'innervation de la pulpe dentaire par chemoattraction (Arthur et

al., 2009). Par ailleurs, de nombreuses études ont révélé les propriétés immuno-modulatrices des cellules souches mésenchymateuses (CSM) issues de différents tissus (Zhang et al., 2004; Liu et al., 2012; Wada et al., 2013). De plus, il a été montré que les CSM favorisent la croissance axonale et l'innervation tissulaire (Mahmood et al., 2013). Des propriétés similaires ont été décrites pour les CSM de la moelle osseuse (Uccelli et al., 2007; Miranda et al., 2014). C'est dans ce contexte que nous avons testé les propriétés immuno-modulatrices des cellules dérivées de la moelle osseuse (CDMO) dans nos conditions expérimentales.

## **Méthodes :**

### **▪ Mise en évidence de relations cellulaires**

Des réassociations cellulaires cultivées ont été implantées en sous-cutané chez la souris Nude pendant deux semaines. Pour mettre en évidence les différentes relations cellulaires, nous avons employé la technique d'immunofluorescence indirecte pour visualiser :

- **Les odontoblastes** à l'aide d'anticorps dirigés contre les antigènes nestine et vimentine.
- **Les axones** à l'aide d'anticorps dirigés contre les antigènes périphérine et NF200.
- **Les cellules gliales** à l'aide d'anticorps dirigés contre les antigènes GFAP et S100 $\beta$ .
- **Les vaisseaux sanguins** à l'aide d'anticorps dirigés contre les antigènes  $\alpha$ -SMA, CD31, CD34, CD146 et collagène de type IV.

Par ailleurs, des contacts et jonctions cellulaires ont été observés en microscopie électronique à transmission (MET).



▪ **Tentative d'immunomodulation par les cellules souches**

Pour tester les propriétés immuno-modulatrices des cellules souches, des prélèvements de moelle osseuse ont été réalisés à partir de tibias et de fémurs de souris ICR GFP positives. Puis, les cellules dérivées de la moelle osseuse (CDMO) ont été cultivées jusqu'au passage 2 avant d'être mélangées dans une proportion de 50% avec des cellules mésenchymateuses dentaires embryonnaires du JE14. Ce mélange cellulaire a été réassocié à des épithéliums dentaires intacts issus du même stade (JE14). Les réassociations cellulaires ainsi obtenues ont été cultivées pendant 8 jours *in vitro* sur milieu semi-solide puis implantées en sous-cutané chez des souris ICR adultes pendant deux semaines.

Le développement dentaire a été analysé en histologie après culture *in vitro* et implantation *in vivo*. Le devenir des CDMO dans les réassociations, pendant la culture *in vitro* et après implantation, a été analysé en immunofluorescence indirecte à l'aide d'un anticorps dirigé contre l'antigène GFP.

La vascularisation et l'innervation dentaires ont été analysées en immunofluorescence indirecte à l'aide d'anticorps dirigés contre l'antigène CD31 et l'antigène périphérine, respectivement.

**Résultats et discussion :**

▪ **Mise en évidence de relations cellulaires**

Après 15 jours d'implantation chez les souris Nude, l'organe dentaire régénéré comporte des vaisseaux sanguins, des axones et des cellules gliales qui colonisent le mésenchyme péri-dentaire, la pulpe dentaire et qui arrivent jusqu'aux odontoblastes.

Au cours du développement, la vascularisation et l'innervation du mésenchyme péri-dentaire précèdent celles de la pulpe dentaire (Nait Lechguer et al., 2008; Luukko, 1997). Dans le mésenchyme péri-dentaire des réassociations cellulaires implantées, des vaisseaux sanguins CD31 positifs et des axones périphérine positifs, présentant une association restreinte, sont observés entre l'os néo-formé et la dent. En revanche, des cellules de Schwann (CS) S100 $\beta$  positives ainsi que des cellules gliales satellites (CGS) GFAP positives sont

observées à proximité des axones. Des résultats similaires sont obtenus dans le cas d'une molaire physiologique à PN7 entre l'os alvéolaire et la dent.

Cependant, lorsque nous avons implanté les réassociations cellulaires chez les souris ICR adultes, nous avons observé, malgré l'absence d'axones, la présence de cellules S100 $\beta$  positives dans la pulpe dentaire. L'origine de ces cellules reste encore à définir. Par ailleurs, les cônes de croissance visualisés à l'aide d'un anticorps dirigé contre l'antigène GAP-43 co-localisent avec les axones au niveau du mésenchyme péri-dentaire. Cependant, contrairement aux molaires physiologiques à PN7, ce marquage n'est pas observé dans le mésenchyme dentaire des réassociations cellulaires implantées. Dans la pulpe dentaire des implants ainsi que des dents physiologiques à PN7, des vaisseaux sanguins entourés de péricytes  $\alpha$ -SMA positifs sont visualisés uniquement dans la partie apicale. Néanmoins, des vaisseaux matures CD146 positifs sont observés dans l'ensemble de la pulpe. Des accollements sont mis en évidence, en immunofluorescence indirecte, entre les axones et ces vaisseaux sanguins. De plus, des contacts sont visualisés entre les axones et les cellules endothéliales ainsi qu'entre deux axones dans la pulpe dentaire en MET. Des résultats similaires ont été décrits pour la pulpe dentaire chez le rat et chez l'homme (Zhang et al., 1998; Iijima and Zhang, 2002). Par ailleurs, il a été décrit que cette innervation vasculaire permet la régulation du flux sanguin par les fibres nerveuses (Olgart, 1996). La présence de deux types de cellules gliales a également été mise en évidence dans la pulpe dentaire de nos implants et des dents physiologiques à PN7. En effet, des CS S100 $\beta$  positives et des CGS GFAP positives sont observées dans l'ensemble de la pulpe. Dans la partie apicale de la pulpe dentaire, les CS présentent une association plus forte avec les péricytes par rapport aux CGS. Cette différence d'affinité est également observée entre ces cellules gliales et les cellules endothéliales dans la partie centrale de la pulpe. Ce résultat suggère que les CS ont probablement un rôle plus important que les CGS au niveau vasculaire.

L'innervation des odontoblastes n'a lieu qu'après deux semaines d'implantation chez les souris Nude (Kökten et al., 2014). Des axones périphérique ou NF200 positifs sont observés entre les odontoblastes nestine ou vimentine positifs en immunofluorescence indirect. De plus, des contacts sont observés en MET entre ces axones non-myélinisés et les odontoblastes. Des résultats similaires sont obtenus pour les dents physiologiques à PN7. Ces résultats sont en accord avec la bibliographie où il a été montré que les axones et les odontoblastes forment des complexes mécano-sensoriels (Magloire et al., 2010). Cependant, les cônes de croissance

axonale visualisés à l'aide d'un anticorps dirigé contre l'antigène GAP-43, sont observés uniquement dans la couche odontoblastique des dents physiologiques à PN7. La raison de leur absence dans les réassociations cellulaires implantées reste à définir. Par ailleurs, les deux types de cellules gliales (CS et CGS) sont également visualisés dans la couche odontoblastique des dents régénérées et physiologiques. Ces cellules gliales sont associées aux axones. Cependant, elles présentent entre elles, une co-distribution partielle dans les réassociations cellulaires implantées ainsi que dans les dents physiologiques à PN7. De plus, nous avons observé une densité plus importante de cellules S100 $\beta$  positives par rapport aux cellules GFAP positives. Ces résultats suggèrent l'existence de deux populations cellulaires gliales différentes dans les réassociations cellulaires implantées ainsi que dans les dents physiologiques à PN7. En revanche, que ce soit pour les dents régénérées ou physiologiques, nous n'avons pas pu visualiser ces cellules dans la couche odontoblastique en MET. Ce résultat est probablement dû à l'incidence de la coupe. Par ailleurs, des vaisseaux sanguins immatures (CD34 positifs et Coll IV positifs) et matures (CD146 positifs) sont observés dans la couche odontoblastique des dents régénérées et physiologiques à PN7. Des contacts entre les cellules endothéliales et les odontoblastes sont visualisés en MET. Il a été montré que les vaisseaux étaient en interactions avec les odontoblastes afin de participer à la minéralisation de la dentine (Yoshida and Ohshima, 1996). Par ailleurs au niveau de cette couche cellulaire, des accolements ainsi que des contacts directs sont visualisés entre les axones et les vaisseaux quel que soit leur degré de maturation. Des accolements sont également observés entre les cellules gliales (CS et CGS) et les vaisseaux de différents degrés de maturation. Néanmoins, les CS présentent une plus grande affinité pour les vaisseaux que les CGS. Ces résultats suggèrent que les axones ainsi que les CS sont également en interactions directes avec les vaisseaux sanguins dans la couche odontoblastique.

#### ▪ Tentatives d'immuno-modulation par les cellules souches

Après 8 jours de culture *in vitro*, les réassociations avec les CDMO présentent une histogenèse épithéliale dentaire avec la formation d'un EDI, d'un EDE, d'un SR et d'un SI. La phase de cytodifférenciation est initiée avec la présence d'odontoblastes fonctionnels sécrétant la pré-dentine.

Après 15 jours d'implantation en sous-cutané chez les souris ICR, les odontoblastes et les améloblastes sont allongés et polarisés. Ils sécrètent respectivement, la pré-dentine/dentine et

l'émail. Ces matrices sont minéralisées et la partie racinaire se développe. De l'os néo-formé est observé dans les tissus péri-dentaires.

Ces résultats suggèrent que les CDMO réassociées aux cellules mésenchymateuses dentaires n'altèrent pas le développement de la dent *in vitro* et *in vivo*.

En effet, les analyses en immunofluorescence indirecte montrent que les CDMO GFP positives sont localisées au niveau du mésenchyme dentaire et en périphérie de la dent après 6 jours de culture *in vitro*. Cependant, elles sont visualisées uniquement en périphérie de la dent régénérée après 8 jours de culture *in vitro* ainsi qu'après deux semaines d'implantation *in vivo*. Ces résultats suggèrent que les CDMO ne participent pas activement au développement de la dent.

Néanmoins, après deux semaines d'implantations en sous-cutané chez les souris ICR, des vaisseaux sanguins CD31 positifs et des axones périphérine positifs sont observés au niveau du mésenchyme péri-dentaire et de la pulpe dentaire. En revanche, dans les réassociations sans CDMO, les axones sont observés uniquement au niveau du mésenchyme péri-dentaire malgré une bonne vascularisation de la pulpe dentaire. Pour autant, contrairement aux réassociations cellulaires dentaires implantées chez les souris Nude ou ICR traitées à la CsA, les axones n'atteignent pas les odontoblastes après deux semaines d'implantation. Enfin, ces résultats suggèrent qu'il est possible d'obtenir un contexte immuno-dépressif avec les CDMO et ainsi favoriser l'innervation des dents régénérées.

Finalement par ces travaux, nous avons montré que les axones qui innervent la pulpe dentaire des dents obtenues par ingénierie établissent des interactions avec diverses cellules (cellules vasculaires, cellules gliales et odontoblastes). Ainsi, ces résultats suggèrent que les fibres nerveuses assurent différentes fonctions (fonction sensorielle, régulation du flux sanguin, régulation de l'inflammation dentaire et homéostasie pulpaire) dans la pulpe dentaire. Par ailleurs, les résultats préliminaires obtenus avec les CDMO permettent d'envisager l'utilisation de cellules souches adultes pour favoriser l'innervation des dents obtenues par ingénierie tissulaire dentaire.

## Experimental Design for the Innervation of Tooth Forming from Implanted Cell Re-associations.

Kökten T.<sup>1,2</sup>, Lesot H.<sup>1,2,\*</sup> and Kuchler-Bopp S.<sup>1,2</sup>

1) INSERM UMR\_S1109, “Osteoarticular and Dental Regenerative Nanomedicine” laboratory, FMTS, Faculty of Medicine, F-67085 Strasbourg Cedex, France.

2) Dental Faculty, Université de Strasbourg, F-67000 Strasbourg, France

\*) Corresponding author : [Lesot@unistra.fr](mailto:Lesot@unistra.fr)

### 1. Short Description of the book chapter

Besides tooth tissue engineering, attempts are made to engineer the whole tooth organ using different methodologies. The approach we developed was designed to mimic the development of the organ as it occurs during embryogenesis. The goal of the studies was to find out a protocol supporting the reformation of a whole tooth from dissociated single cells. For this purpose, embryonic dental cells were used as a source initially having the required odontogenic potential. A two steps protocol has been designed: 1) by co-culturing pellets of epithelial and mesenchymal cells in contact with each other, so that a multicusped crown could form, and, 2) by implanting these cultured re-associations under the skin of adult mice, to allow the functional differentiation of cells secreting predentin/dentin, enamel and cementum, as well as the initiation of root formation. In these conditions, the forming teeth were vascularized, which supported the growth of the organ as well the mineralization of dental matrices. In these conditions however, the dental mesenchyme was not innervated spontaneously. Previous studies had shown that the innervation required immunodepressed conditions: implantation in cyclosporin A-treated ICR mice or in Nude mice. In this chapter, the innervation of engineered teeth, which formed after implantation in Nude mice, was compared to the physiological situation in newborn ICR mice at similar developmental stages. A specific attention was given to a critical area: the odontoblast layer. Further comparative observations were performed to look at the neurovascular relationships in the odontoblast layer, in the dental pulp and in the peridental mesenchyme. Finally, preliminary experiments were performed to try to avoid the use of cyclosporin A by testing the effects of bone marrow derived cells on the innervation of the dental pulp.

### 2. Abbreviations

$\alpha$ -SMA: alpha smooth muscle actin; BDNF: brain-derived neurotrophic factor; BM-MSC: bone marrow mesenchymal stem cell; BMDC: bone marrow derived cell; CD34: cluster of differentiation 34; CsA: cyclosporin A; CXCL: chemokine ligand; DPSC: dental pulp stem cell; ED: embryonic day; GAP-43: growth-associated protein-43; GDNF: glial-derived neurotrophic factor; GFAP: glial fibrillary acidic protein; GFP: green fluorescent protein; MSC: mesenchymal stem cell; NF200: neurofilament 200; NGF: nerve growth factor; PN: post-natal; PNS: peripheral nervous system; TEM: transmission electron microscopy; TG: trigeminal ganglion.

### 3. Introduction

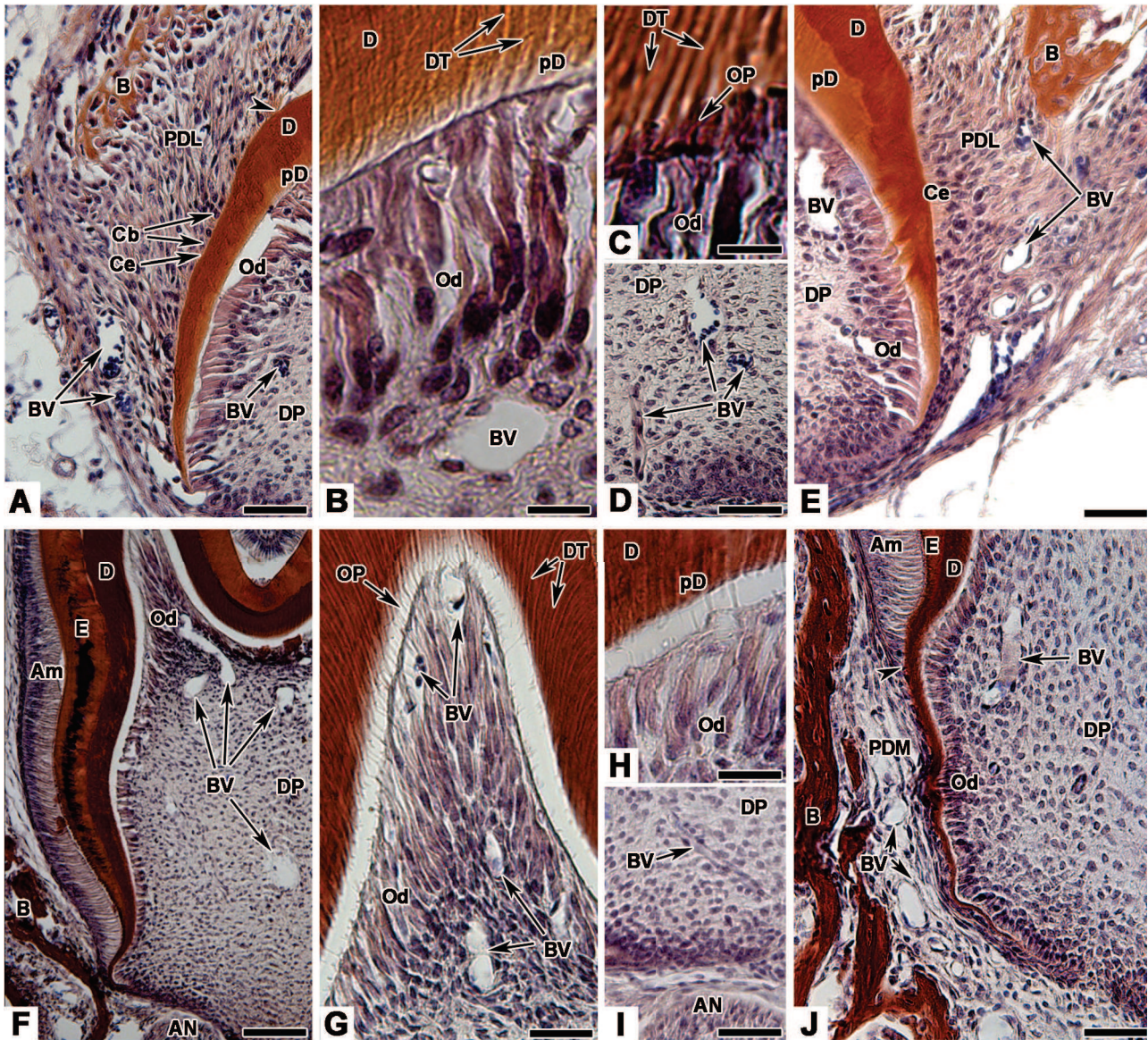
Tooth engineering may refer to either dental tissue regeneration or to the reformation of a complete organ attached to surrounding bone [1–4]. In case of whole tooth organ engineering the use of embryonic dental cells allowed to search for the simplest experimental protocol to be developed in order to maintain and express odontogenic cell potentialities. This was achieved after implantation under the skin or in the kidney capsule or in the jaw of adult mice of cultured re-associations between pellets of dissociated single epithelial and mesenchymal cells [5–7]. The main points that actually need further research concern the identification of non dental cells able to engage in whole tooth formation [8–12], anchoring of the newly formed tooth root to surrounding alveolar bone [3,9,13], and innervation of the engineered organ [14].

The innervation of dental and peridental tissues has been extensively investigated during tooth development in the mouse [15–19]. The timing and pattern of tooth innervation are controlled by diffusible signaling molecules and ultimately by epithelial-mesenchymal interactions [15,20]. Tooth innervation is particularly important in signaling damage in the crown, but also may interfere with several functions including the regulation of blood flow, tissue homeostasis, immune cell function, inflammation, and healing [21,22]. The innervation of engineered tooth germs does not occur spontaneously after implantation, but requires immunodepressed conditions: cyclosporin A (CsA) treatment of the host mice or implantation under the skin of immunocompromised Nude mice [23]. New questions arising from this previous work are discussed in this chapter. They concern a) the nature of relationships between axons and other cells in the dental pulp (odontoblasts, glial cells and blood vessels: endothelial cells and pericytes) in the case of cell re-associations implanted in Nude mice, b) the differential innervation of the dental and peridental mesenchymes, and c) experimental attempts to avoid the use of CsA or related molecules to achieve dental pulp innervation [23]. For this purpose, specific cell re-associations were designed and analyzed, after *in vitro* culture and further implantation in adult mice, by means of histology, transmission electron microscopy and immunofluorescence. After two weeks of implantation, the cell re-associations reached a stage corresponding to a first lower molar at post-natal day 4 (PN4), when taking into account the crown development and stage of matrix deposition and mineralization [24,25]. However, axons reached the odontoblast layer, which in physiological conditions, occurs at PN7 only [23]. For this reason, the status of innervation in cell re-associations implanted for two weeks was compared to the situation in mouse first lower molar at PN7.



#### 4. Cellular network mediating sensory function in the dental mesenchyme

Interactions between axons and other cells have been investigated in the human dental pulp [26]. The situation in tooth forming from implanted cell re-associations is not known. To analyze it, re-associations between dissociated dental embryonic epithelial and mesenchymal cells were cultured for seven days, then trigeminal ganglia were put in contact with the re-associations and cultured overnight before implantation in Nude mice (for detailed method and scheme of the protocol, see [23]). This protocol was selected because it allows the development of a whole tooth organ (Figure 1A-E; [24]), in conditions where the cellular heterogeneity in the dental mesenchyme can be maintained as it is in physiological conditions [25]. The localization of axons and glial cells, their relationships, and also with neighbor cells will be discussed in three complementary contexts: 1) with odontoblasts (Figures 2 and 4), 2) with microvessels present in the odontoblast layer (Figure 5) and 3) with blood vessels in the dental and peridental mesenchymes (Figures 6 and 8). These observations will be compared to what exists in the mesenchyme of a molar tooth at a similar developmental stage (PN7).



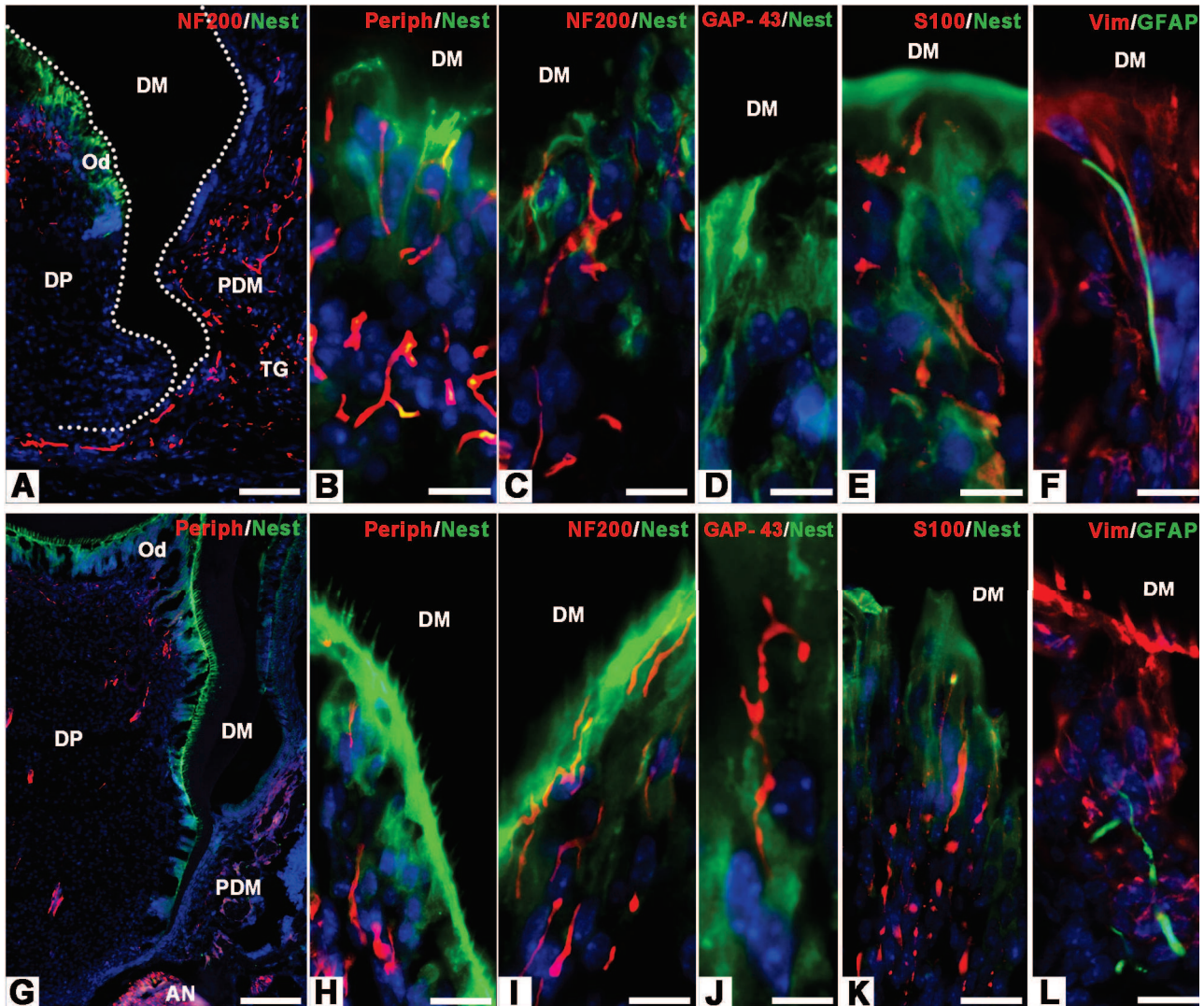
**Figure 1.** Histology of cultured cell re-associations implanted for two weeks under the skin of Nude mice (A-E) and of the first lower molar of ICR mice at post-natal day 7 (PN7) (F-J). The protocols for cell dissociation, re-association, culture, implantation and innervation have been detailed elsewhere [23]. All procedures were designed in compliance with the recommendations of the European Union (2010/63/EU) for the care and use of laboratory animals [23]. For histology, samples were fixed in Bouin-Hollande and demineralized in 15% EDTA before their inclusion in paraffin. Serial sections (7  $\mu$ m) were stained with Mallory's stain. After implantation of cell re-associations for two weeks under skin, crown was developed and root initiated (A, E), as in the developing molar at PN7 (F, J). Arrowheads showed the limit between crown and root in implanted cell re-associations (A), as in molar at PN7 (J). In implanted cell re-associations as in molars at PN7, blood vessels (BV) were present in the dental pulp (DP) (compare D, E with F, I, J) and reached the odontoblast (Od) layer (compare B with G). In both cases, odontoblasts were elongated and polarized, as seen from the position of their nucleus, opposite to the secretory pole (compare B with G, H). These cells were also functional,



secreted predentin (pD) and dentin (A, B, E and H). Dentinal tubules (DT) and odontoblast cell processes (OP) were observed in the dentin of implanted cell re-associations as in molars at PN7 (compare B, C with G, H). In both types of samples, ameloblasts (Am) were elongated, polarized and secreted enamel (J, see [23]). Newly formed bone was present at the periphery of implanted cell re-associations (A, E) corresponding to alveolar bone in molar at PN7 (F, J). In contact with the external surface of root dentin, cementoblasts (Cb) were observed in implanted cell re-associations (A). These cells were functional and deposited cementum (Ce) (A, E). Periodontal ligament (PDL) fibers were attached to the root by cementum and extended until reaching newly formed bone (A, E). AN: Alveolar nerve; B: Bone; D: Dentin; E: Enamel. Scale bars = 80  $\mu$ m (F); 40  $\mu$ m (A, D, E, F, G, I, J) and 20  $\mu$ m (B, C, H).

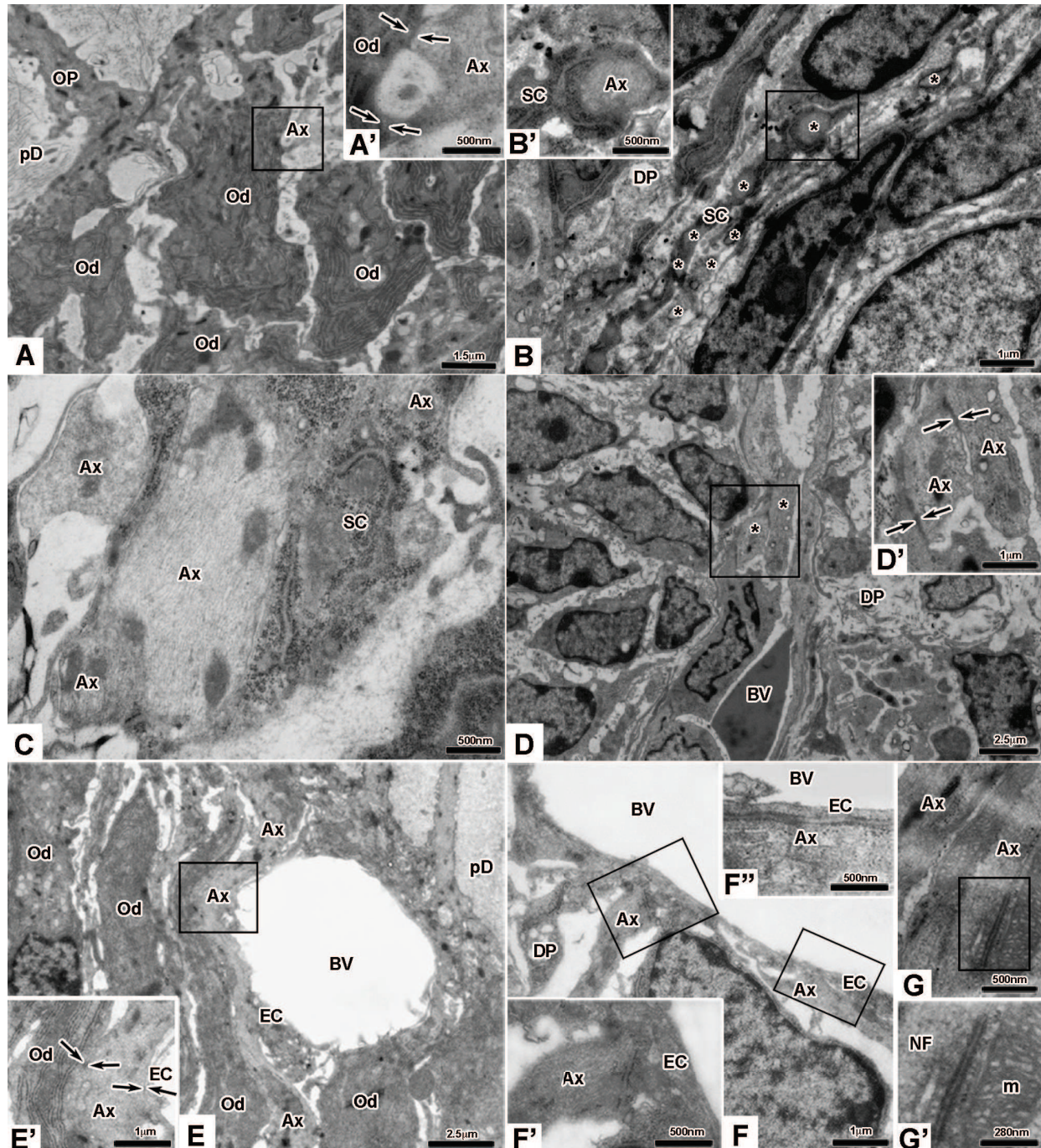
#### 4.1. Innervation in the odontoblast layer

After implantation for two weeks in Nude mice, cell differentiation was achieved in the crown part of the tooth (Figure 1A-C) as it occurs after implantation in ICR mice (Charles River CD-1, [24]) or during molar development (Figure 1F-H, J). In implanted cell re-associations as in molar at PN7, odontoblasts were functional and secreted predentin and dentin constituents in the crown (compare Figure 1C, E with Figure 1G, H) and root portions (compare Figure 1A, E with Figure 1J). The cells were elongated with a nucleus in basal position (Figure 1B, G, H). Odontoblast cell processes were present in the dentinal tubules (Figure 1B, C, G, H). These cell processes are involved in the secretion and permanent mecanosensing in the matrix (for review, see [27–29]). The innervation was analyzed using antibodies to peripherin and neurofilament-200 (NF200) [18,30]. After two weeks of implantation of cell re-associations in Nude mice, axons positive for peripherin (Figure 2B) reached the layer of odontoblasts, which are positive for nestin (Figure 2A-E) or vimentin (Figure 2F). The same was observed in the first molar at PN7 (Figure 2H, G). Similarly, antibodies to NF200 allowed the detection of axons in the dental mesenchyme and reaching the odontoblasts of teeth forming from implanted cell re-associations (Figure 2A, C) as in molars at PN7 (Figure 2I). NF200 is a marker for myelinated A-fibers and previous observations by transmission electron microscopy showed that such fibers could not be detected in implanted re-associations [23], probably due to the too short period of implantation. For this reason and despite the positive reaction to anti-NF200 antibodies, all further detections of axons were performed using antibodies to peripherin.





**Figure 2.** Innervation in the odontoblast layer of cell re-associations implanted for two weeks in Nude mice (A-F), compared to first lower molar at PN7 (G-L). Odontoblasts (Od) were labeled with anti-nestin (A-E and G-K) or anti-vimentin antibodies (F, L). Axons were labeled for peripherin (B, G, H) or NF200 (A, C, I) and glial cells using antibodies to either S100-beta (E, K) or GFAP (F, L). Growth cones were labeled for GAP-43 (D, J). In case of implanted re-associations, axons coming from the trigeminal ganglion (TG) entered the dental mesenchyme and reached the odontoblast layer, as seen after staining for NF200 (A). Similarly, the dental mesenchyme of first lower molar at PN7 was innervated by alveolar nerve (AN) as shown after staining for peripherin (G). Higher magnifications showed that axons positive for either peripherin or NF200 were present in the odontoblast layer, but did not enter the dentinal tubules, neither in implanted cell re-associations (B, C), nor in molars at PN7 (H, I). Growth cones were present in the odontoblast layer of molars at PN7 (J), but not in the case of implanted cell re-associations (D). S100-beta positive glial cells were detected in the odontoblast layer of implanted cell re-associations (E), as in intact molars at PN7 (K). The same was observed for GFAP positive glial cells (compare F with L). DM: dental matrix; DP: dental pulp; PDM: peridental mesenchyme. Scale bars = 80  $\mu$ m (A, G) and 20  $\mu$ m (B-F and H-L).



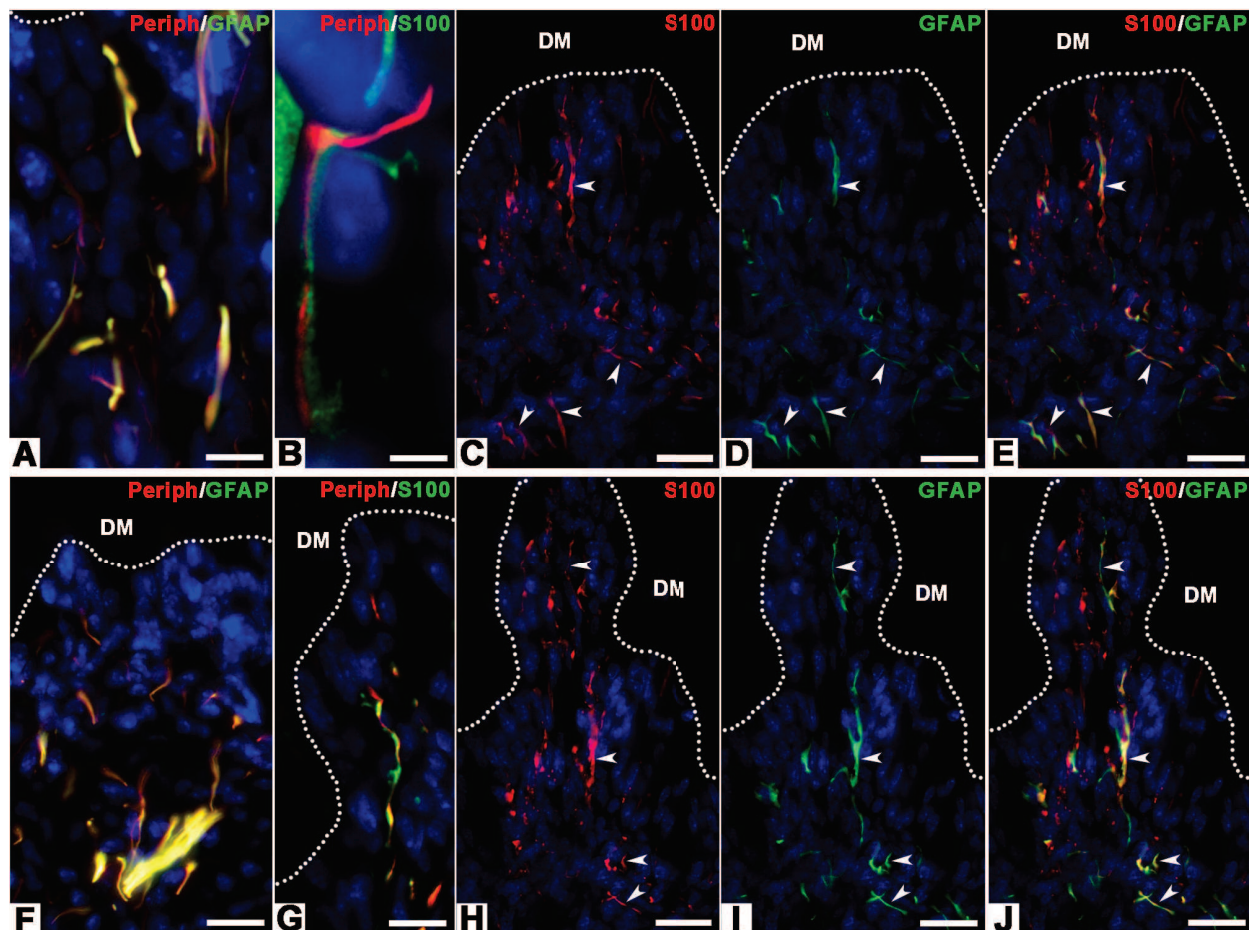
**Figure 3.** Transmission electron microscopy of cell re-associations implanted for two weeks in Nude mice (A-D') and first lower molar at PN7 (E-G'). Unmyelinated axons (Ax) were present in the odontoblast layer of implanted cell re-associations (A, A').



Arrows in A' showed contacts between an axon and an odontoblast (Od). In the dental pulp (DP) of teeth forming from re-associations, Schwann cells (SC) in contact with or wrapping around axons were seen (B, B', C). In the apical part of the pulp (D, D') unmyelinated axons were present in proximity of blood vessel (BV) and arrows in D' showed contacts between axons. In the odontoblast layer of molar at PN7, an axon showed contact with an endothelial cell (EC) and with an odontoblast (E, arrows in E'). In the dental pulp, axons were in contact with endothelial cells (F, F', F''). Also, a contact between two axons was visualized in molar at PN7 (G, G'). Ax and \*: unmyelinated axon; m: mitochondria; NF: neurofilament; OP: odontoblast process; pD: predentin.

Axons had not yet reached the odontoblast processes present in predentin/dentin, neither in cell re-associations implanted for two weeks (Figure 2A-C), nor in the molar at PN7 (Figure 2H, I). In the mouse first lower molar, the presence of axons in dentinal tubules was only detected at PN10, and still very few were observed there [23]. Nagahama et al., [31] reported that a subodontoblastic nerve plexus develops at about PN11 in the first molar, and dentinal innervation still continue to increase in the crown after tooth eruption (PN20). In the crown of mature human primary teeth, nerve endings terminate in or near the odontoblast layer, with a small number penetrating into dentin [32]. Odontoblasts and neighbor axons have been suggested to form a mechanosensory complex (for review see [29]). This raises the question of who is doing what when axons are also present in dentinal tubules [33]. Although Carda and Peydró [33] reported the existence of membrane densifications, similar to synapses in between odontoblast processes and nerve endings, there is a general agreement in the literature that true synapses do not exist in between the two cell types. Instead, appositions with a narrow extracellular gap have been reported [34,35]. Such apposition was also observed by transmission electron microscopy in implanted re-associations (Figure 3A, arrows in A') as well as in molars at PN7 (Figure 3E, arrows in E'). The question on how signals sensed by odontoblasts are transmitted to axons remains unsolved [29].

GAP-43 is an intracellular growth-associated protein. It was suggested to participate in neuronal pathfinding and branching during development and regeneration, by integrating plasma membrane and cytoskeletal responses to extracellular signals [36]. Staining for GAP-43 allows the visualization of growth cone, at the tip of axons [37,38]. More surprisingly, GAP-43 is also expressed by Schwann cells in rat molars [39]. *In vitro* and *in vivo* observations showed that, when related to Schwann cells, GAP-43 was expressed by their precursors and by non-myelinating mature cells [40]. Double stainings for GAP-43 and nestin did not show the presence of GAP-43 in the odontoblast layer in implanted re-associations (Figure 2D), while it was present there in the first molar at PN7 (Figure 2J). GAP-43, in the re-associations, was only detected in the peridental mesenchyme as discussed below. The reasons for this absence of GAP-43 in most parts of the dental mesenchyme from implanted cell re-associations will have to be further investigated. It might have important consequences on later stages of tooth innervation [41]. It will thus be necessary to go further by looking at the situation when cultured cell re-associations are implanted in CsA-treated mice. Indeed, CsA can interfere with GAP-43 expression [42].



**Figure 4.** Glial cells in the odontoblast layer of cell re-associations implanted for two weeks in Nude mice (A-E), compared to first lower molars at PN7 (F-J). Axons were visualized with anti-peripherin antibody (A-B and F-G) and glial cells using antibodies to either S100-beta (B, C, E and G, H, J) or GFAP (A, D, E and F, I, J). In implanted cell re-associations as well as in molar at PN7, axons and glial cells were detected in the odontoblast layer (compare A, B with F, G). In the odontoblast layer of implanted cell re-associations, GFAP positive glial cells were associated with axons (A), as in the first lower molar at PN7 (F). The same results were observed for S100-beta positive glial cells (compare B with G). Double stainings for S100-beta and GFAP showed the presence of distinct glial cell types (C-E) as in intact molars at PN7 (H-J). More cells were positive for S100-beta than for GFAP and the two antigens showed only partial co-distribution in implanted cell re-associations (arrowheads in C-E), as in molar at PN7 (arrowheads in H-J). DM: dental matrix. Scale bars = 20  $\mu$ m (A, C-J) and 8  $\mu$ m (B).

Different glial cell types have been observed in the dental and peridental mesenchymes in rodents as in human [43,44]. Glial cells have multiple functions during the development of the peripheral nervous system (PNS) and in repair process [45]. During early PNS development, axonal signals are critical for Schwann cell migration, survival and proliferation [46,47]. In the present study, glial cells were searched for, using antibodies to either S100-beta or glial fibrillary acidic protein (GFAP) (for review, see [46]). In the implanted re-associations, S100-beta and GFAP were detected in the odontoblast layer (Figure 4A, B), as in the intact molar at PN7 (Figure 4F, G). The two antigens showed associations with axons, as seen after double-stainings using anti-peripherin antibodies, in the re-associations (Figure 4A, B) as in the molar at PN7 (Figure 4F, G). Furthermore, S100-beta and GFAP positive cells showed only partial co-distribution in the re-associations (arrowheads in Figure 4C-E), as in the molar at PN7 (arrowheads in Figure 4H-J). More GFAP-positive than S100-beta-positive cells were associated with axons. More cells were positive for S100-beta than for GFAP in implanted cell re-associations (Figure 4E) as in intact molars (Figure 4J). These complementary observations indicate that several populations of glial cells are present in implanted cell re-associations, as in a developing molar, in physiological conditions.

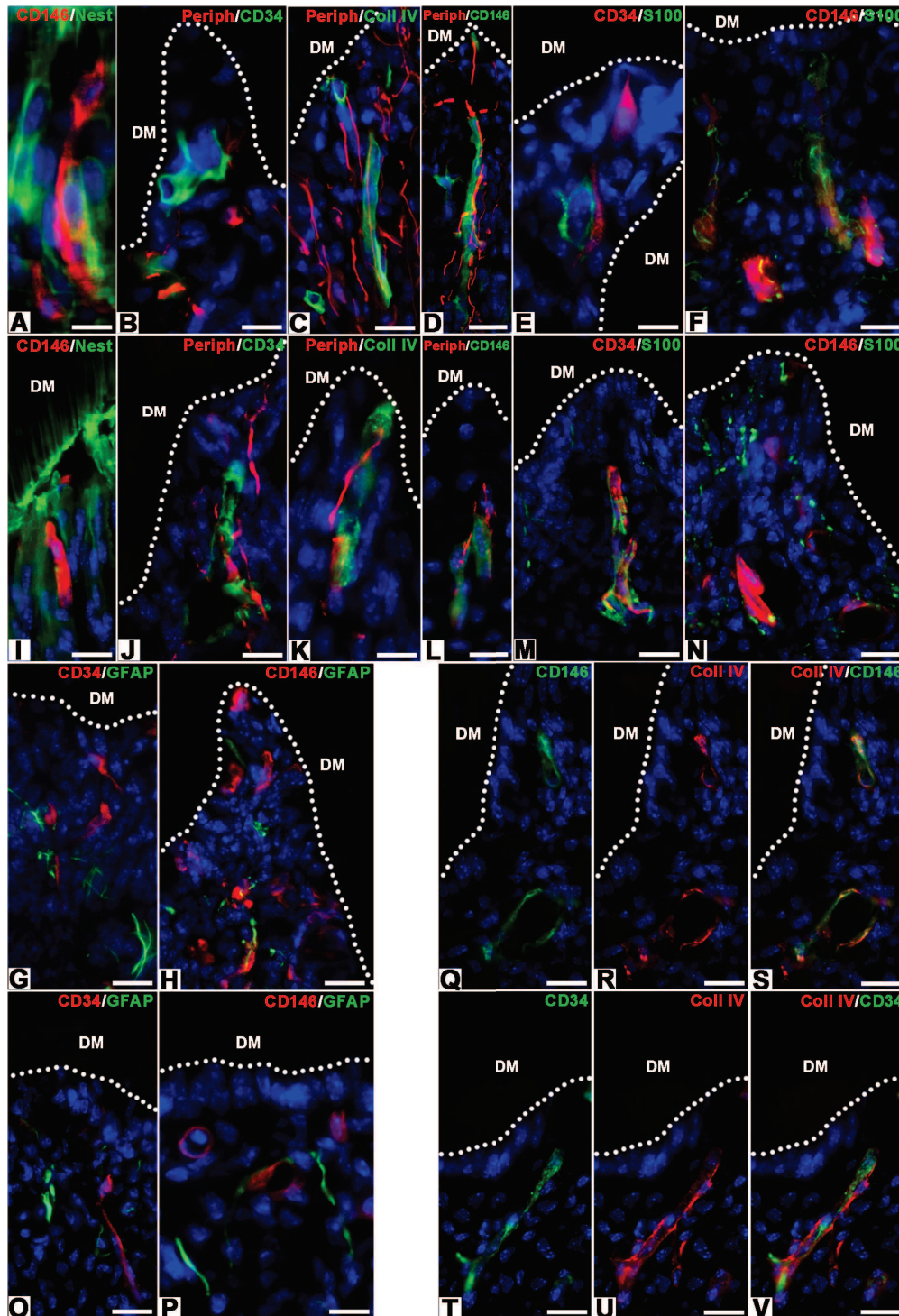
#### 4.2. Blood vessels-axons relationships in the odontoblast layer

Microvessels are present in the odontoblast layer in re-associations implanted for two weeks in either Nude mice (Figure 5; [23]), or in ICR mice [48]. These microvessels in the odontoblast layer were detected after staining for CD34, collagen type IV or CD146 in implanted cell re-associations (Figure 5A-H) as in molars at PN7 (Figure 5I-P). All three antigens were found to co-distribute, as shown after double stainings for CD146 and collagen type IV (Figure 5Q-S) or for CD34 and collagen type IV (Figure 5T-V). The same was observed in molars at PN7 (data not shown). CD146, a marker of endothelial cells and pericytes, was detected in microvessels from the odontoblast layer in implanted re-associations (Figure 5A, D, F, H), as in molars at PN7 (Figure 5I, L, N, P). However, staining for  $\alpha$ -SMA, a marker of smooth muscle cells, was detected in pericytes associated with large vessels in the apical part of the dental mesenchyme [25], but not in the odontoblast layer, neither in implanted cell re-associations nor in molars at PN7 (Figure 6G, K).

The timing of capillaries development and their entering the odontoblast layer (Figure 3E, E') has been correlated with the mineral requirement for dentinogenesis [49]. The relative roles of odontoblasts and capillaries present in this cell layer in the transport of calcium during dentin mineralization has been discussed previously [50]. In the odontoblast layer, double stainings for peripherin and either CD34, or collagen IV, or CD146 showed that very frequently axons were detected in close proximity with capillaries (Figure 5B-D). Such neurovascular relationships were also documented in molars at PN7 (Figure 5J-L). Transmission electron microscopy confirmed these observations and further showed that there exist direct interactions (Figure 3E, E'). Tabata et al., [51] suggested that the innervation of capillaries might be involved in the regulation of blood flow as in larger vessels. Although most pulp axons are sensory ones, both sensory and sympathetic axons can make contacts with dental pulp vessels [34]. Sympathetic axons have been detected in the odontoblast layer, although not extending in dentinal tubules [52].

Double stainings were performed to compare the distribution of glial cells as visualized after staining for S100-beta or GFAP, with that of microvessels visualized after staining for CD34 or CD146 (Figure 5). In implanted re-associations, S100-beta positive cells showed more proximity with microvessels (Figure 5E, F) than GFAP positive glial cells (Figure 5G, H). The same was observed in molars at PN7 (compare Figure 5M, N with Figure 5O, P). This confirms the differential patterning of S100-beta versus GFAP-positive glial cells as discussed above. Furthermore, the stainings for S100-beta in the odontoblast layer of implanted re-associations or molars at PN7 (Figure 5F, M) are in good agreement with observations made in the dental pulp of adult human tooth where the S100-beta positive cells were ensheating blood vessels [26]. Due to the angle of sectioning, several layers of nuclei corresponded to functional odontoblasts at the tip of the cusps (Figure 1G). Typical Schwann cells were not observed by transmission electron microscopy in the odontoblast layer of implanted re-associations or molars at PN7. This fits with previous report showing that in the mouse molar, Schwann cells were present near the base of the odontoblast layer from PN9 and were not detected in the odontoblast layer before PN50-60 [53].

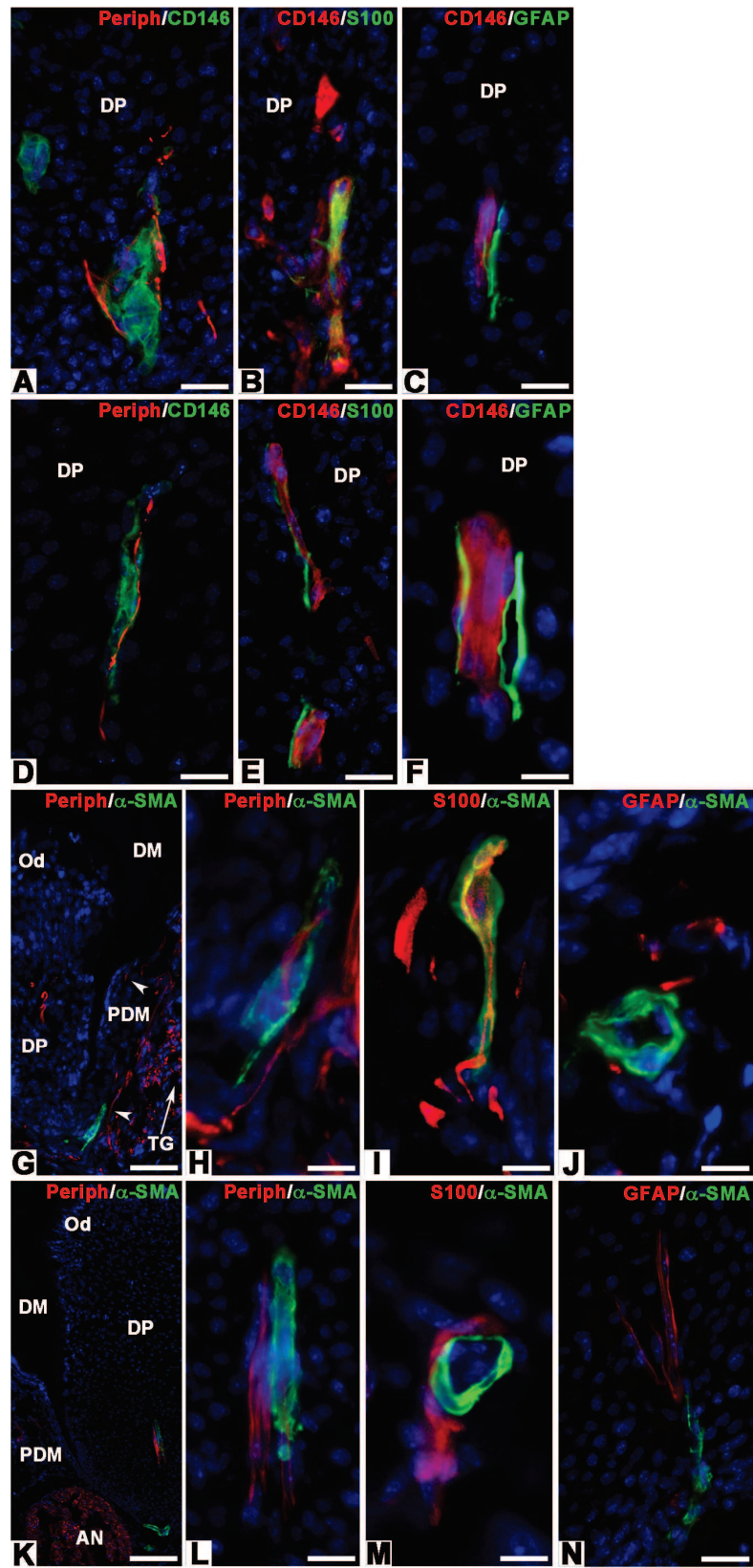




**Figure 5.** Neurovascular relationships in the odontoblast layer of cell re-associations implanted for two weeks in Nude mice (A-H and Q-V), compared to first lower molar at PN7 (I-P). Odontoblasts were labeled with an anti-nestin antibody (A, I). Blood vessels were either labeled for CD146 (A, D, F, H, I, L, N, P, Q, S), CD34 (B, E, G, J, M, O, T, V), collagen type IV (C, K, R, S, U, V). Axons were labeled with anti-peripherin antibody (B-D, J-L) and glial cells using either anti-S100-beta (E, F, M, N) or anti-GFAP antibodies (G, H, O, P). Blood vessels were present in the odontoblast layer in implanted cell re-associations (A), as in the first lower molar at PN7 (I). In both cases also, axons were detected in the odontoblast layer and showed close proximity with blood vessels (compare B-D with J-L). CD146 (Q) and collagen type IV (R) were detected in the same blood vessels (S) and the same was observed when comparing the localization of CD34 and collagen type IV (T-V). In the odontoblast layer of implanted cell re-associations, as in molar at PN7, glial cells were detected after staining for S100-beta (compare E, F with M, N) or for GFAP (compare G, H with O, P). In both cases, a certain proportion of glial cells were detected next to blood vessels positive with CD34 (compare E, M with G, O) or CD146 (compare F, N with H, P). DM: dental matrix. Scale bars = 20  $\mu$ m.

**4.3. Blood vessels-axons relationships in the central and apical parts of the dental mesenchyme**

The progressive vascularization of the dental mesenchyme has been studied during mouse molar development [48,54] as well as in implanted cell re-associations [25,48]. The vascularization in implanted intact molars or cell re-associations showed similar density but was slightly retarded in re-associations. The implantation of cell re-associations in GFP mice showed that all blood vessels in the implant originated from the host [48].

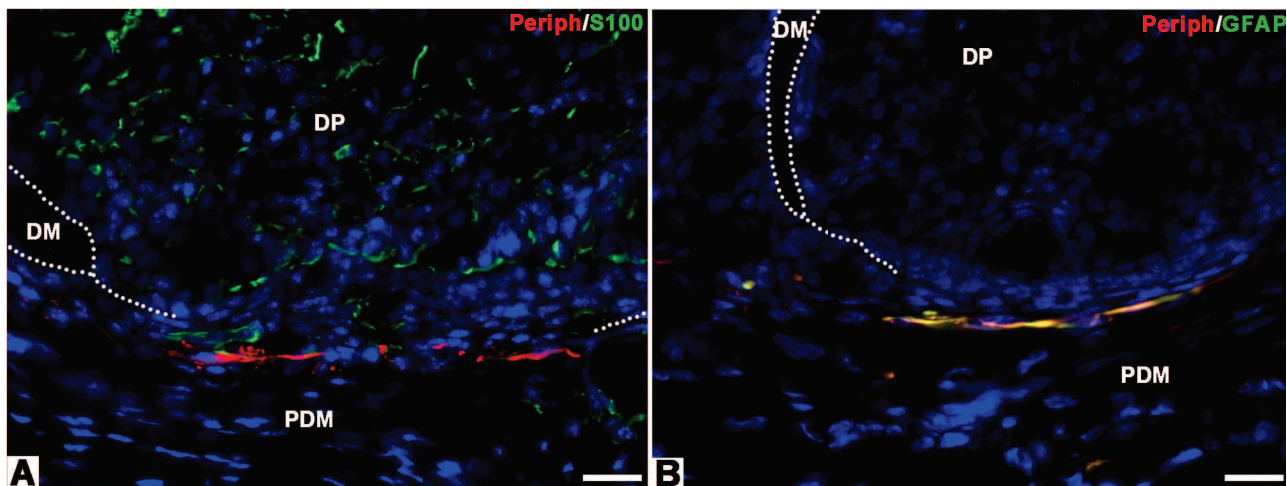




**Figure 6.** Neurovascular relationships in the central (A-F) and apical parts (G-N) of the dental mesenchyme of cell re-associations implanted for two weeks in Nude mice (A-C, G-J), compared to first lower molar at PN7 (D-F, K-N). Blood vessels were labeled with an anti-CD146 antibody (A-F) in the central part of the dental mesenchyme and with an anti- $\alpha$ -SMA antibody in its apical part (G-N). Axons were detected with an anti-peripherin antibody (A, D, G, H, K, L) and glial cells using antibodies to either S100-beta (B, E, I, M) or GFAP (C, F, J, N). In implanted re-associations, axons originating from the trigeminal ganglion (TG) extended in the peridental mesenchyme (arrowheads) and dental pulp (G). In the central part of the dental mesenchyme, close relationships were observed between axons and blood vessels in implanted cell re-associations (A) as in the first lower molar at PN7 (D). In both types of samples, more vicinity was observed between blood vessels and S100-beta positive cells than with GFAP positive glial cells (compare B, E with C, F). In implanted cell re-associations pericytes positive for  $\alpha$ -SMA surrounded large blood vessels and were detected only in the apical part of the dental mesenchyme (K). In both cases, axons were also detected in close proximity with  $\alpha$ -SMA positive blood vessels (H, L). In implanted cell re-associations as in molars at PN7, some S100-beta positive (compare I with M), and GFAP positive glial cells (compare J with N) were detected next to pericytes. However, S100-beta positive cells showed more proximity with pericytes than GFAP positive ones (compare I, M with J, N). AN: alveolar nerve; DM: dental matrix; DP: dental pulp; Od: odontoblast; PDM: peridental mesenchyme. Scale bars = 80  $\mu$ m (K); 40  $\mu$ m (G) and 20  $\mu$ m (A-F, H-J, L-N).

In the developing molar, pericytes positive for  $\alpha$ -SMA were detected only from PN4 in the dental mesenchyme. They were observed in association with large blood vessels at the apical part of the pulp both in the intact molar (Figure 1I; Figure 6K-N) as in cell re-associations implanted for two weeks (Figure 1D; Figure 6G-J; [25]). Pericytes are involved in the development, maturation, stabilization, and remodeling of capillaries and small vessels [55–57]. These cells are also involved in the regulation of capillary blood flow [58]. Still pericytes were suggested to possibly act as mesenchymal stem cells (MSCs) [59–61]. A study performed with mouse incisor as a model showed that pericytes, together with other MSCs-like cells, could participate in tooth growth and repair, giving rise to odontoblasts and odontoblast-like cells [62].

Transmission electron microscopy and double immunostainings for peripherin and CD146 showed close proximity between axons and blood vessels in the central part of the dental pulp of implanted cell re-associations (Figure 3D; Figure 6A), as in intact molars (Figure 3F, F', F''; Figure 6D). Such relationships have also been reported in the case of rat and human teeth by scanning electron microscopy, which showed a dense network of interactions between axons and vessels [63,64]. Transmission electron microscopy also showed contacts between axons in implanted cell re-associations (Figure 3D') as in molar at PN7 (Figure 3G, G'). Blood vessels in the dental pulp are innervated by sensory and sympathetic nerve fibers [17,21]. Both sensory and sympathetic axons would be positive for peripherin. However during development, sensory nerves enter the dental mesenchyme at PN3-4, while sympathetic nerves penetrate this tissue much later, at PN9 [17]. Sympathetic axons are mainly detected in the deeper pulp along the blood vessels [65]. They are involved in vasoregulation [22,66]. Due to their late entering in the dental mesenchyme in physiological conditions, sympathetic nerves should be absent from the re-associations implanted for two weeks.



**Figure 7.** Innervation of cell re-associations implanted for two weeks in ICR mice without cyclosporine A treatment (A, B). Axons were labeled with anti-peripherin antibody (A, B) and glial cells using antibodies to either S100-beta (A) or GFAP (B). In such experimental conditions, axons remained at the border between the peridental mesenchyme (PDM) and dental pulp (DP) but did not enter the dental pulp (A, B). Similarly, GFAP positive glial cells co-localized with axons, at the limit between the peridental mesenchyme and dental pulp of the forming tooth (B). S100-beta positive glial cells showed a broader pattern, being present in close proximity with axons in the peridental mesenchyme, as well in the dental pulp (A). DM: dental matrix. Scale bars = 20  $\mu$ m.

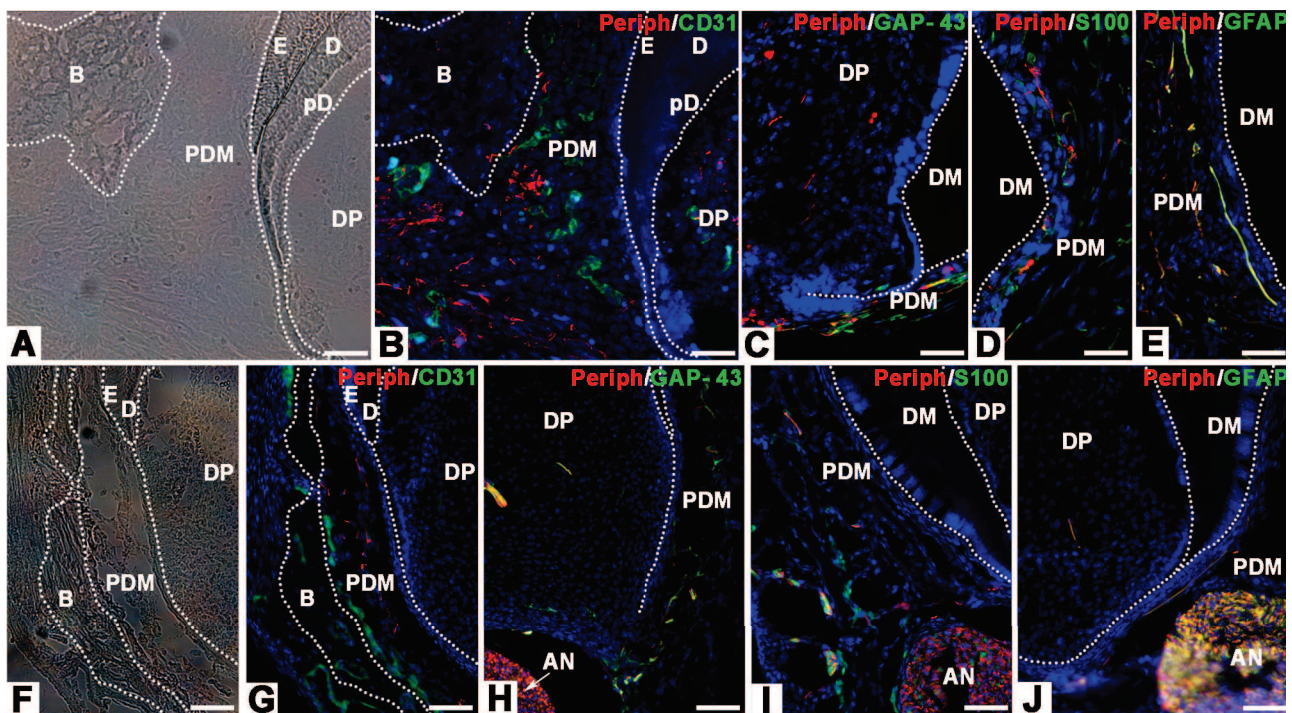
Neurovascular bundles present in the dental mesenchyme have been suggested to represent a niche for stem cells [59,67]. Immunostainings performed in the human dental pulp showed that STRO-1 positive cells were present in the walls of blood vessels and perineurium surrounding the nerve bundles, while absent in the layer of mature odontoblasts [59]. These authors suggested that the potentialities of this minor stem cell population should be tested to search for a possible ability to differentiate into functional neuronal-like cells. Recently, this was supported by cultures of murine dental pulp stem cells (DPSC) under neuroinductive conditions [68]. Although STRO-1 cannot be searched for in mouse tissues, the immunostaining for peripherin remained negative

when cell re-associations (Figure 7A, B) or even intact molars at PN4 were implanted for two weeks in ICR mice in the absence of a trigeminal ganglion [14]. Thus, if dental pulp stem cells can differentiate into neuronal-like cells *in vitro*, this potential was neither expressed in implanted intact molars at PN4 [14] nor in teeth forming after implantation of cultured cell re-associations [23]. Higuchi et al. [69] have reported the re-innervation of Embryonic Day (ED)18 rat molar germs after they were implanted under the skin of adult Wistar rats for eight weeks. Unfortunately, the early stages when the dental pulp first started to be re-innervated were not analyzed [69]. Nevertheless, these results suggest that, from a certain stage, immunodepressed conditions may no longer be necessary to allow dental pulp innervation.

When cell re-associations were implanted in Nude mice, both S100-beta and GFAP positive cells were detected in the dental pulp, which sometimes could be in close proximity with blood vessels (Figure 6B, C). The same was observed in molars at PN7 (Figure 6E, F). Both in implanted re-associations (Figure 6I, J) and in intact molars (Figure 6M, N), S100-beta positive cells showed more proximity with pericytes than GFAP positive cells. Transmission electron microscopy showed the presence of Schwann cells in the dental pulp of re-associations implanted in CsA-treated mice [23]. When cell re-associations were implanted in ICR mice without CsA treatment, the innervation of the dental mesenchyme was not possible: the dental mesenchyme remained negative for peripherin (Figure 7A, B; [23]). Nevertheless, glial cells expressing S100-beta (Figure 7A), but not GFAP (Figure 7B), were present in the dental mesenchyme. These results agree with previous observations showing that, in human pulp tissues, S100-beta and GFAP are expressed by different cell types, showing distinct patterns [26]. The origin of glial cells present in the dental pulp is not known. Implantation experiments will have to be performed in GFP mice to determine whether S100-beta positive cells have an endogenous origin, come from the host or have a mixed origin, as already observed for other dental pulp cells [25]. Glial cells in dental tissues from rodents appeared quite heterogeneous [43] and in the human dental pulp as well [26]. Schwann cells ensheating axons were observed in the dental pulp of cell re-association (Figure 3B, B', C). Schwann cells are derived from neural crest cells, and were considered to consist in two types whether myelinating or not, both being involved in the maintenance of axons [70,71]. Differences were also found when comparing Schwann cells in the dental and periodontal mesenchymes [43]. These cells show a remarkable plasticity during reparative processes, as being able to dedifferentiate and participate in re-innervation by directing axonal regrowth and re-myelination [45]. Recently, culture conditions were determined, which allowed human dental pulp stem cells to undergo Schwann-like cell differentiation and to support neural outgrowth *in vitro* [72].

## 5. Innervation of the periodontium

As a component of the periodontium, the periodontal ligament mediates the attachment of the tooth to surrounding alveolar bone (Figure 1J). The periodontal ligament fibers are the main constituent of the ligament. This tissue is also vascularized (Figure 1J), innervated (Figure 8G) and contains a dense network of mechanoreceptors [73,74]. The periodontal ligament develops in parallel with root formation [75]. During development, the vascularization of the dental sac (prospective periodontal mesenchyme) largely precedes the vascularization of the dental mesenchyme [48]. Similarly, nerves come close to the condensing dental mesenchyme long before the periodontium differentiates and becomes innervated [15,76,77].



**Figure 8.** Innervation of the periodontal mesenchyme of cell re-associations implanted for two weeks in Nude mice (A-E), compared to first lower molars at PN7 (F-J). Axons were visualized using an antibody to peripherin (B-E, G-J) and their growth cones with an anti-GAP-43 antibody (C, H). Glial cells were labeled using antibodies to either S100-beta (D, I) or GFAP (E, J). Blood vessels were



labeled with an anti-CD31 antibody (B, G). Newly formed bone was detected at the periphery of implanted cell re-associations (A, B), analogous to the alveolar bone surrounding the molar at PN7 (F, G). In both cases, axons and blood vessels were observed in the peridental mesenchyme (PDM) between bone and dental tissues (compare B with G). Also, growth cones were detected, which co-distributed with axons in the peridental mesenchyme of implanted cell re-associations (C), as in intact molar at PN7 (H). GAP-43 and peripherin also co-distributed in the dental pulp of molar at PN7 (H). However, GAP-43 was not detected in the dental pulp (DP) of tooth forming from implanted cell re-associations (C). In the peridental mesenchyme of implanted cell re-associations as well as in molars at PN7, different glial cell types were detected after staining for S100-beta (compare D with I) or GFAP (compare E with J). In both cases, these different glial cell types were observed next to axons in the peridental mesenchyme (compare D, E with I, J). AN: alveolar nerve; B: bone; D: dentin; DM: dental matrix; E: enamel; pD: predentin. Scale bars = 40  $\mu$ m (A-C and E-J) and 20  $\mu$ m (D).

In the mesenchyme surrounding the forming tooth in implanted re-associations, blood vessels and axons were detected, but showed only a limited degree of associations (Figure 8A, B). The same was observed in molars at PN7 (Figure 8F, G). In implanted re-associations, S100-beta positive and also GFAP-positive cells were detected in association with axons (Figure 8D, E), as in molars at PN7 (Figure 8I, J). In implanted re-associations, there were co-localizations of peripherin and GAP-43 in the peridental mesenchyme, but not in the dental pulp (Figure 8C). However the situation was different in the molar at PN7, where such co-localizations were found in the peridental and dental mesenchymes (Figure 8H).

Besides sensory axons, the periodontal ligament also contains sympathetic neurons, which are involved in bone remodeling [78,79]. However, this could not be investigated in the present experimental design. Implantation of cell re-associations would have to be performed in the jaw, which still raises major difficulties to correctly position the implant, with prospective roots having a correct orientation in the jaw [48]. When cell re-associations had been cultured for eight days, the crown morphology of the forming teeth is well visible (Figure 10B). However, the shape of the material to be implanted is more or less spherical (Figure 10B). It is thus very difficult to avoid a rotation of the samples during their implantation [2], although in some instances, it could be very well achieved [9].

The engineering of tooth root and periodontium (Figure 1E) is now considered as the main point in tooth engineering [80]. Indeed, complementary approaches to address this question are in progress [81–83]. The presence of axons in the peridental mesenchyme of engineered teeth has been observed after implantation in ICR mice i.e. in conditions where the dental mesenchyme cannot be innervated [23]. This indicates that not only the kinetics but also the conditions allowing innervation (immunodepressed conditions) are different in the dental and peridental mesenchymes.

## 6. Attempts to replace cyclosporin A treatment by using stem cells

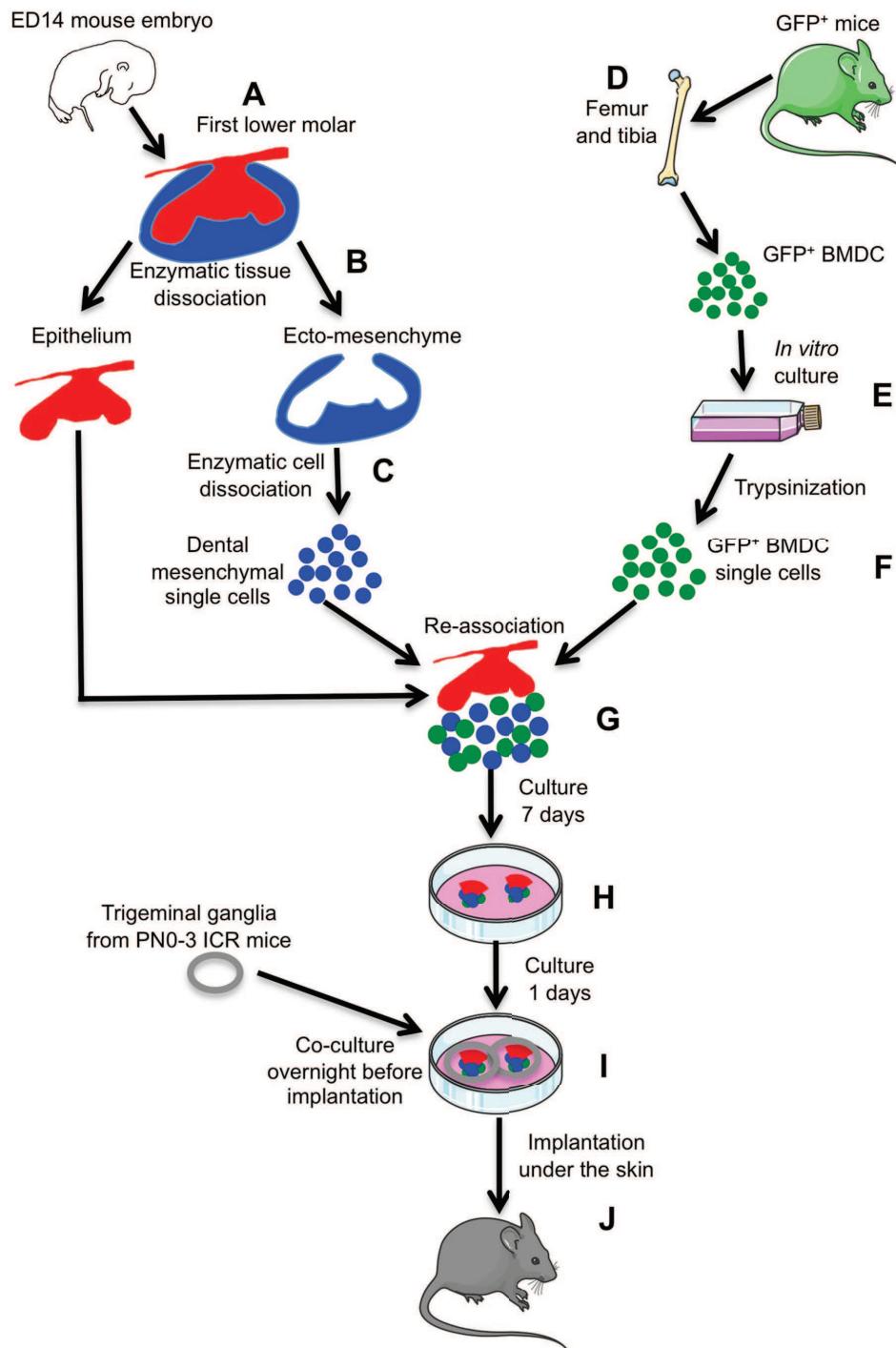
The entering of axons in the dental mesenchyme of cell re-associations implanted under the skin of adult mice requires an artificially created immunodepression: treatment of host mice with CsA or implantation in Nude mice [23]. This requirement is not a consequence of a possible change in the mesenchymal cell heterogeneity/behavior during tissue and cell dissociation steps prior to re-association, culture, and implantation. Indeed, the same was observed when implanting intact PN4 molars [14]. The importance of immunomodulation, as observed for the re-innervation in the clinical context of face transplantation [84], has also been reported in a reparative process [85]. The next question was: how to avoid the use of CsA, which actually represents a heavy constraint in view of clinical application [23]?

Stem cells have been suggested to facilitate pulp innervation, possibly by chemoattraction [86]. Before stem cells were taken into account, dental pulp cells were known to interfere with neuron survival and differentiation *in vitro*, which was correlated with their expressing a wide range of neurotrophic factors [87,88]. These included Nerve growth factor (NGF), brain-derived neurotrophic factor (BDNF), glial-derived neurotrophic factor (GDNF), and chemokine ligand (CXCL)12 [88]. Other studies led to propose a potential role of mesenchymal stem cells (MSCs) in immunomodulation, by exerting an immunosuppressive effect on cells from both innate and acquired immunity systems [89–91]. Dental and peridental MSCs also showed such properties [92–95]. Some of these MSCs might originate from pericytes [96], although other origins have also been suspected [62]. The number of pericytes as visualized using antibodies to  $\alpha$ -SMA was very limited in re-associations implanted for two weeks (Figure 6G). MSCs from different origins have been shown to stimulate axonal sprouting and tissue innervation [97]. Bone marrow also contains mesenchymal stem cells (BM-MSCs) exhibiting immunomodulatory and regulatory properties [98,99]. BM-MSCs have been shown to stimulate neurite outgrowth, probably due to their expressing NGF and BDNF under specific experimental conditions [100]. Since bone marrow cells can be easily prepared in large quantities, they were tested for their possible effect in stimulating dental pulp innervation, to possibly avoid the use of CsA.

For this purpose, bone marrow derived cells (BMDCs) [8] were used at passage two [101]. Re-associations between mixed BMDCs/dental mesenchymal cells and an intact dental epithelium from the cap stage at ED14 (Figure 9G) were cultured for eight days *in vitro* (Figure 9H, I) and analyzed for tissue organization and cell differentiation (Figure 10A, C). BMDCs were prepared from GFP mice (Figure 9D) in order to follow their fate in cultured re-associations (Figure 11). Histology of cultured re-associations demonstrated that teeth could develop *in vitro* when mixed BMDCs/mesenchymal cells at a ratio of 50% were re-associated with an ED14 competent dental epithelium and cultured for 8 days (Figure 10A-C), as in the absence of BMDCs (Figure 11F; [24]). Although initially mixed with dental mesenchymal cells, GFP-labeled BMDCs were only detected in the dental mesenchyme and at the periphery of the forming tooth after 6 days of culture (Figure 11A). After 8 days, all BMDCs were located at the periphery of the forming tooth (Figure 11B). This suggests that, in these experimental conditions, BMDCs do not directly participate in the late stages of tooth formation (i.e. odontoblast differentiation). This is further supported by histology showing rather small teeth forming, which

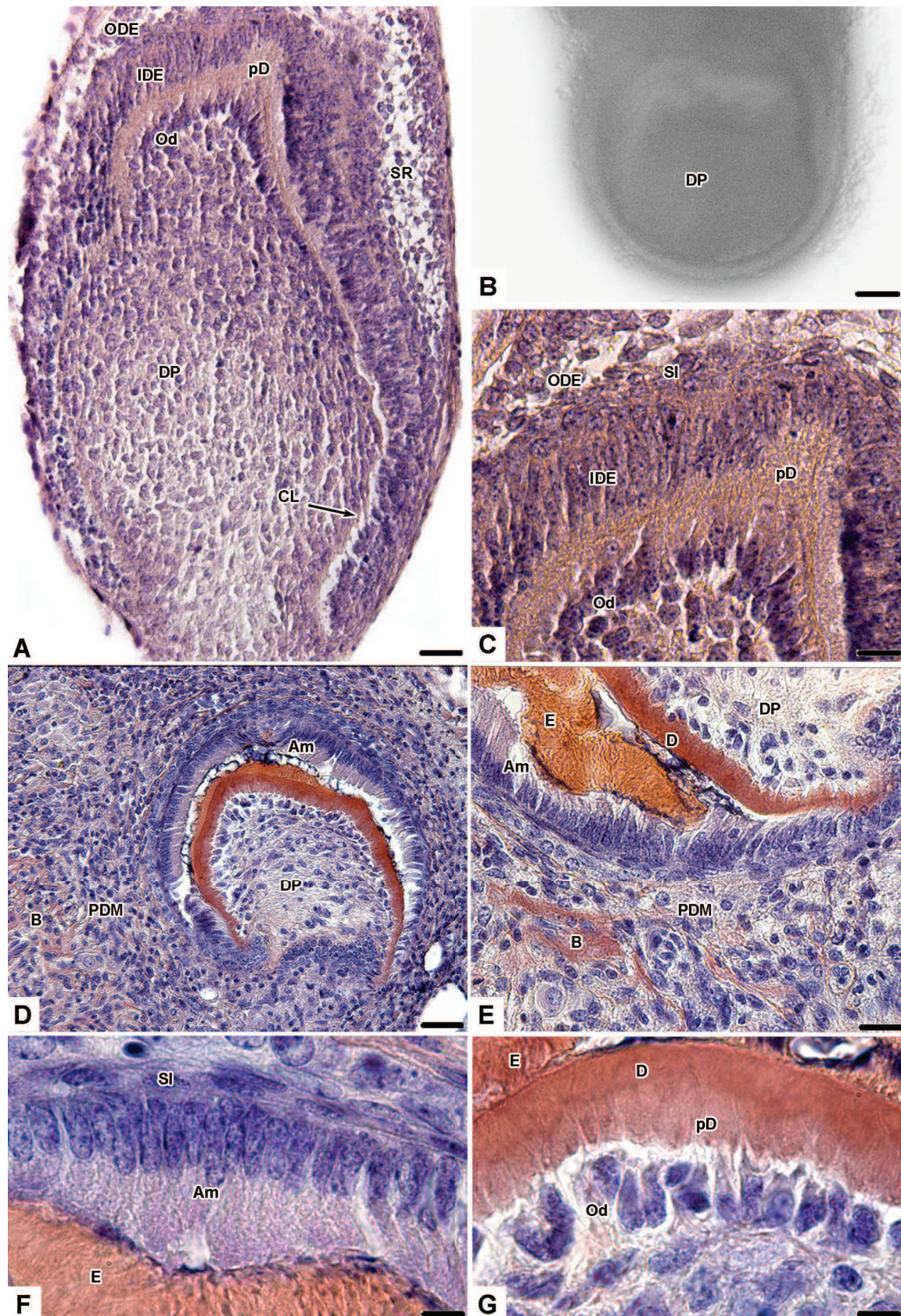


can be related to the lower number of dental mesenchymal cells used for the re-associations, when mixed 50:50 with BMDCs (Figure 10D).



**Figure 9.** Schematic representation of the experimental procedures to test the effects of bone marrow derived cells on the innervation of implanted cells/tissue re-associations. The mandibular first molars were dissected from ICR embryos at ED14 (A). The dental epithelium and ecto-mesenchyme were dissociated by enzymatic treatment (B). Then dental ecto-mesenchyme was dissociated into single cells (C) and mixed with bone marrow derived cells (50:50) (G). For this purpose, bone marrow derived cells were prepared from femur and tibias bones (D), dissected from adult GFP positive mice (C57BL/6 from the IGBMC, Illkirch, France). The bone marrow derived cells (BDMCs) were cultured *in vitro* and used at passage 2 (E). After trypsinization, BDMCs single cells (F) were mixed with the dental mesenchymal single cells and put in contact with an ED14 intact dental epithelium (G). These re-associations were cultured for 7 days *in vitro* (H) and then a trigeminal ganglion was put on the top of each re-association for a further co-culture overnight (I). These re-associations were implanted between the skin and muscles behind the ears in adult ICR mice and maintained for two weeks (J).



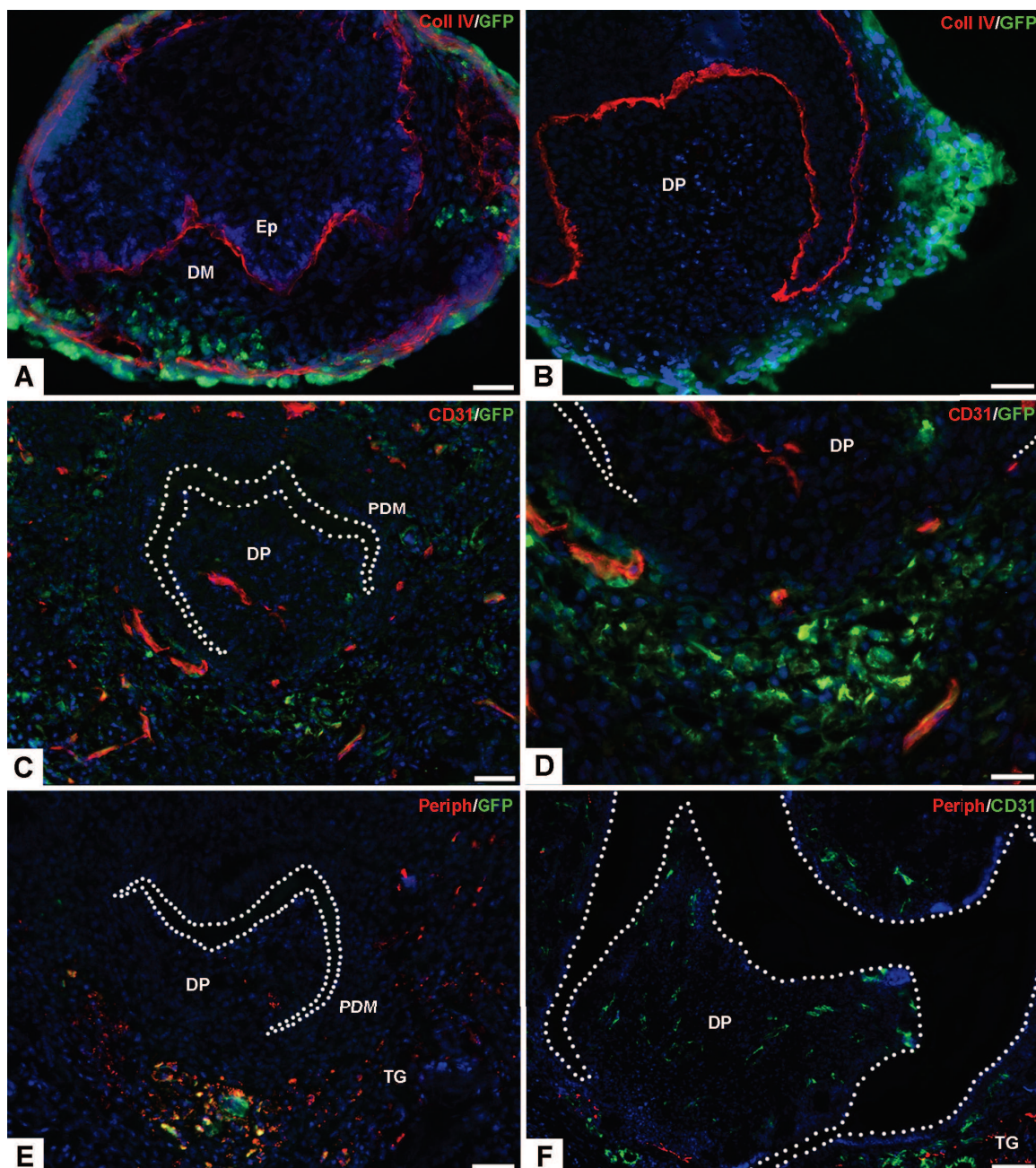


**Figure 10.** Histology of re-associations between an enamel organ and mixed dental mesenchymal cells and bone marrow derived cells prior to implantation (A-C) and implanted for two weeks under the skin of ICR mice (D-G). Re-associations between mixed BMDCs/dental mesenchymal cells (50:50) and an intact dental epithelium from the cap stage at embryonic days 14 (ED14) were cultured before implantation for two weeks under the skin of ICR mice. After eight days in culture, cells/tissue re-associations



showed a characteristic dental epithelial histogenesis, with the presence of the inner (IDE) and outer dental epithelium (ODE), the stellate reticulum (SR) (A) and the stratum intermedium (SI) (C). Odontoblasts (Od) were differentiated and induced the differentiation of ameloblasts (Am), which elongated (A). Odontoblasts secreted predentin (pD) (A, C). After implantation (D-G), crown (D) and root (E) were developed and newly formed bone (B) was present next to the tooth (E). Ameloblasts were elongated, polarized and secreted enamel (F). Ameloblasts were in contact with the stratum intermedium (F). Odontoblasts were elongated and polarized with their nucleus opposite to the secretory pole (G). They were functional, secreting predentin/dentin and dentinal tubules were visible (G). CL: cervical loop; D: dentin; DP: dental pulp; E: enamel; PDM: peridental mesenchyme. Scale bars = 80  $\mu$ m (B); 40  $\mu$ m (A, D); 20  $\mu$ m (C, E) and 8  $\mu$ m (F, G).

To investigate the possible re-innervation of such re-associations, a trigeminal ganglion (TG) was deposited on top of cells/tissue re-associations cultured for 7 days (Figure 9I), and maintained *in vitro* overnight prior to implantation under the skin of ICR mice (Figure 9J). Implants were maintained for two weeks in order to allow direct comparison with previous results obtained after implantation in CsA-treated mice or Nude mice [23]. Histology showed the presence of functional odontoblasts secreting predentin/dentin (Figure 10G) and thus inducing the differentiation of functional ameloblasts secreting enamel (Figure 10E, F). Double stainings for CD31 and peripherin showed the presence of blood vessels in the dental and peridental mesenchymes (Figure 11C, D, 7:7 samples (100%)). Few axons only were detected in the dental mesenchyme (Figure 11E, 3:7 samples (42%)), while the control re-associations without BMDCs remained negative for peripherin (Figure 11F). However, in these preliminary experiments, axons did not reach the odontoblast layer (Figure 11E).



**Figure 11.** Vascularization and innervation of re-associations between mixed dental cells and bone marrow derived cells and an intact dental epithelium cultured for six days (A), or eight days (B), or cultured and implanted for two weeks with a trigeminal ganglion (C-E), and control re-associations without bone marrow-derived cells (F). Implantations were performed under the skin of ICR mice. The epithelial-mesenchymal junction was labeled with an antibody against collagen type IV (A, B). Blood vessels were labeled with an antibody to CD31 (C, D, F) and axons with an antibody to peripherin (E, F). GFP positive bone marrow derived cells (BMDCs) were labeled with a specific antibody to GFP (A-E). After six days in culture, BMDCs were present in the dental mesenchyme (DM) and at the periphery of the forming tooth (A). After eight days in culture, GFP-positive BMDCs were only detected at the periphery of the forming tooth (B). After two weeks of implantation, blood vessels were present in the peridental tissues and could enter the dental pulp (DP) in cell re-associations with BMDCs (C, D), as in cell re-associations without BMDCs (F). In implanted cell re-associations with BMDCs, axons from the trigeminal ganglion (TG) were detected in the dental pulp (E), while in control re-associations (without BMDCs) axons were observed only at the limit between the peridental mesenchyme (PDM) and dental pulp (F). After implantation for two weeks, GFP positive BMDCs were detected only in the periphery of the forming tooth and not in the dental pulp (C-E). Ep: epithelium; PDM. Scale bars = 40  $\mu$ m (A-C, E, F) and 20  $\mu$ m (D).

From the literature, several mechanisms have been proposed to try to explain how exogenous stem cells might stimulate innervation. They include cell replacement, neurotrophic support or immunomodulation and may vary with different target tissues. In the experimental conditions reported here, the possibility of differentiation towards neural cells can be rejected since, already before implantation, bone marrow cells no longer remained present in the dental mesenchyme, which developed during the *in vitro* culture of the re-associations (Figure 11B). Furthermore, the axons present in the dental mesenchyme remained GFP negative (Figure 11E). Nevertheless, these preliminary experiments will have to be completed a) by increasing their number, b) by further testing BMDCs at different passages, and c) by testing sub-populations of these BMDCs.

## 7. Conclusions and prospects

All together, the results presented here show how far it is possible to reproduce the innervation of the dental and peridental mesenchymes in teeth forming from cultured and implanted cell re-associations, as it may occur during odontogenesis. As long as immunodepressed conditions can be maintained (implantation in Nude mice), it is possible within two weeks of implantation to reproduce the innervation of the dental mesenchyme, with axons reaching odontoblasts. Glial cells were present as well, although further work will be necessary to determine their origin. Still some differences exist when comparing the situation in implanted re-associations with developing molars. It will be necessary to determine how far these might result from differences in the kinetic of innervation in the two conditions and whether this would have further consequences after longer implantation period. Longer implantations would also allow determining whether myelinisation can be achieved. Using a method described by Honda et al., [102], implantation in the jaw, next to the alveolar nerve, will have to be tested to try to better approach the physiological situation and see whether tooth innervation can occur in these conditions. At the same time, this might allow the sympathetic innervation of the tooth, thus avoiding parallel experiments where cell re-associations would have to be grown in contact with a superior cervical ganglion.

The method used here will have to be adjusted when new non-dental mesenchymal cell sources will become available to engage in whole tooth engineering. Indeed, dental embryonic cells represent a very convenient tool to design and try to simplify experimental conditions for tooth organ engineering. However, such cells would not be available in a clinical context, so that several other cell sources are being tested (for review see [2,80,103]). Dental embryonic cells were also a convenient model to investigate the rapid loss of odontogenic potentialities with aging and after *in vitro* culture [104]. Despite the presence of a morphogenetic center, the primary enamel knot, the enamel organ at the cap stage has no more odontogenic potential [105]. Previous studies offered the possibility to use younger epithelial sources, when still retaining odontogenic inductive potential as tested for tooth engineering [8]. Obviously the odontogenic potentialities of dental pulp cells rapidly decrease during development and are quite poor in adult tissues. This can be seen from reparative processes, which are quite limited physiologically and lead to osteodentin instead of tubular dentin in most experimental conditions [62,106]. For this reason, the design of experimental conditions where non dental cells can be induced to give rise to odontoblasts secreting tubular dentin [8,59] or to ameloblasts secreting enamel may require important technical adjustments [107–109]. Investigating the innervation of the mesenchyme and more specifically of the odontoblast layer forming in these conditions will be a future challenge.

## 8. Acknowledgments

The authors thank Prof. Jean-Christophe Maurin for help with trigeminal ganglia dissection, Jean-Luc Weickert and Dr. Nadia Messaddeq for their help with transmission electron microscopy and Hervé Gegout for the histology. Tunay Kökten was funded by the Dental Faculty, University of Strasbourg.

## 9. References

- [1] Huang GT. Dental pulp and dentin tissue engineering and regeneration: advancement and challenge. Front. Biosci. (Elite Ed). 2011;3 788–800.

- [2] Kuchler-Bopp S, Keller L, Poliard A, Lesot H. Tooth Organ Engineering: Biological Constraints Specifying Experimental Approaches. In: Eberli D, éditeur. *Tissue Engineering for Tissue and Organ Regeneration* [Internet]. InTech; 2011 <http://www.intechopen.com/books/tissue-engineering-for-tissue-and-organ-regeneration/tooth-organ-engineering-biological-constraints-specifying-experimental-approaches>.
- [3] Oshima M, Mizuno M, Imamura A, Ogawa M, Yasukawa M, Yamazaki H, Morita R, Ikeda E, Nakao K, Takano-Yamamoto T, Kasugai S, Saito M, Tsuji T. Functional tooth regeneration using a bioengineered tooth unit as a mature organ replacement regenerative therapy. *PLoS ONE*. 2011;6(7) e21531.
- [4] Hynes K, Menicanin D, Gronthos S, Bartold PM. Clinical utility of stem cells for periodontal regeneration. *Periodontol*. 2000. 2012;59(1) 203–227.
- [5] 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) 2069–2075.
- [6] Nakao K, Morita R, Saji Y, Ishida K, Tomita Y, Ogawa M, Saitoh M, Tomooka Y, Tsuji T. The development of a bioengineered organ germ method. *Nat. Methods*. 2007;4(3) 227–230.
- [7] 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) 183–192.
- [8] Ohazama A, Modino SAC, Miletich I, Sharpe PT. Stem-cell-based tissue engineering of murine teeth. *J. Dent. Res*. 2004;83(7):518–522.
- [9] Yen AHH, Sharpe PT. Stem cells and tooth tissue engineering. *Cell Tissue Res*. 2008;331(1) 359–372.
- [10] Nakahara T. Potential feasibility of dental stem cells for regenerative therapies: stem cell transplantation and whole-tooth engineering. *Odontology*. 2011; 99(2) 105–111.
- [11] Otsu K, Kumakami-Sakano M, Fujiwara N, Kikuchi K, Keller L, Lesot H, Harada H. Stem cell sources for tooth regeneration: current status and future prospects. *Front Physiol*. 2014;5 36.
- [12]. Zhang Y, Chen Y. Bioengineering of a human whole tooth: progress and challenge. *Cell Regeneration*. 2014;3(1) 8.
- [13] Keller L, Kökten T, Kuchler-Bopp S, Lesot H. Tooth organ engineering. In “Stem Cell Biology and Tissue Engineering in Dental Sciences.” (A. Vishwakarma, P. Sharpe, S. Shi, X.-P. Wang, M. Ramalingam, Eds), in press.
- [14] Keller L, Kuchler-Bopp S, Lesot H. Whole-Tooth Engineering and Cell Sources. In: Huang GT-J, Thesleff I, éditeurs. *Stem Cells in Craniofacial Development and Regeneration*. John Wiley & Sons, Inc.; 2013 p431–446. <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/9781118498026.ch24/summary>.
- [15] Mohamed SS, Atkinson ME. A histological study of the innervation of developing mouse teeth. *J. Anat*. 1983;136(Pt 4) 735–749.
- [16] Matsuo S, Ichikawa H, Henderson TA, Silos-Santiago I, Barbacid M, Arends JJ, Jacquin MF. trkA modulation of developing somatosensory neurons in oro-facial tissues: tooth pulp fibers are absent in trkA knockout mice. *Neuroscience*. 2001;105(3) 747–760.
- [17] Moe K, Kettunen P, Kvinnsland IH, Luukko K. Development of the pioneer sympathetic innervation into the dental pulp of the mouse mandibular first molar. *Arch. Oral Biol*. 2008;53(9) 865–873.
- [18] Moe K, Sijaona A, Shrestha A, Kettunen P, Taniguchi M, Luukko K. Semaphorin 3A controls timing and patterning of the dental pulp innervation. *Differentiation*. 2012;84(5) 371–379.
- [19] Luukko K, Kettunen P. Coordination of tooth morphogenesis and neuronal development through tissue interactions: Lessons from mouse models. *Exp. Cell Res*. 2014;325(2) 72–77.
- [20] Kettunen P, Løes S, Furmanek T, Fjeld K, Kvinnsland IH, Behar O, Yagi T, Fujisawa H, Vainio S, Taniguchi M, Luukko K. Coordination of trigeminal axon navigation and patterning with tooth organ formation: epithelial-mesenchymal interactions, and epithelial Wnt4 and Tgfbeta1 regulate semaphorin 3a expression in the dental mesenchyme. *Development*. 2005;132(2) 323–334.



- [21] Olgart L. Neural control of pulpal blood flow. *Crit. Rev. Oral Biol. Med.* 1996;7(2) 159–171.
- [22] Byers MR, Suzuki H, Maeda T. Dental neuroplasticity, neuro-pulpal interactions, and nerve regeneration. *Microsc. Res. Tech.* 2003;60(5) 503–515.
- [23] Kökten T, Bécavin T, Keller L, Weickert J-L, Kuchler-Bopp S, Lesot H. Immunomodulation stimulates the innervation of engineered tooth organ. *PLoS ONE.* 2014;9(1) e86011.
- [24] Lechgauer AN, Couble ML, Labert N, Kuchler-Bopp S, Keller L, Magloire H, Bleicher F, Lesot H. Cell Differentiation and Matrix Organization in Engineered Teeth. *J. Dent. Res.* 2011;90(5) 583–589.
- [25] Keller LV, Kuchler-Bopp S, Lesot H. Restoring physiological cell heterogeneity in the mesenchyme during tooth engineering. *Int. J. Dev. Biol.* 2012;56(9) 737–746.
- [26] Farahani RM, Simonian M, Hunter N. Blueprint of an ancestral neurosensory organ revealed in glial networks in human dental pulp. *J. Comp. Neurol.* 2011;519(16) 3306–3326.
- [27] Linde A, Goldberg M. Dentinogenesis. *Crit. Rev. Oral Biol. Med.* 1993;4(5) 679–728.
- [28] Ruch JV, Lesot H, Bègue-Kirn C. Odontoblast differentiation. *Int. J. Dev. Biol.* 1995;39(1) 51–68.
- [29] Magloire H, Maurin JC, Couble ML, Shibukawa Y, Tsumura M, Thivichon-Prince B, Bleicher F. Topical review. Dental pain and odontoblasts: facts and hypotheses. *J. Orofac. Pain.* 2010;24(4) 335–349.
- [30] Vang H, Chung G, Kim HY, Park S-B, Jung SJ, Kim J-S, Oh SB. Neurochemical properties of dental primary afferent neurons. *Exp. Neurobiol.* 2012;21(2) 68–74.
- [31] Nagahama SI, Cunningham ML, Lee MY, Byers MR. Normal development of dental innervation and nerve/tissue interactions in the colony-stimulating factor-1 deficient osteopetrotic mouse. *Dev. Dyn.* 1998;211(1) 52–59.
- [32] Egan CA, Hector MP, Bishop MA. On the pulpal nerve supply in primary human teeth: evidence for the innervation of primary dentine. *Int. J. Paediatr. Dent.* 1999;9(1) 57–66.
- [33] Carda C, Peydró A. Ultrastructural patterns of human dentinal tubules, odontoblasts processes and nerve fibres. *Tissue Cell.* 2006 ;38(2) 141–150.
- [34] Byers MR. Dental sensory receptors. *Int. Rev. Neurobiol.* 1984;25 39–94.
- [35] Ibuki T, Kido MA, Kiyoshima T, Terada Y, Tanaka T. An ultrastructural study of the relationship between sensory trigeminal nerves and odontoblasts in rat dentin/pulp as demonstrated by the anterograde transport of wheat germ agglutinin-horseradish peroxidase (WGA-HRP). *J. Dent. Res.* 1996;75(12) 1963–1970.
- [36] Shen Y, Mani S, Donovan SL, Schwob JE, Meiri KF. Growth-associated protein-43 is required for commissural axon guidance in the developing vertebrate nervous system. *J. Neurosci.* 2002;22(1) 239–247.
- [37] Fried K, Risling M. Growth-associated protein (GAP-43)-like immunoreactivity in primary and permanent tooth pulp nerve fibers of the cat. *Brain Res.* 1992;572(1-2) 19–26.
- [38] Ishizuka H, Hiura A. A light and electron microscopic study on pulpal nerve fibers in the lower incisor of the mouse. *Arch. Histol. Cytol.* 1992;55(2) 167–178.
- [39] Maeda T, Byers MR. Different localizations of growth-associated protein (GAP-43) in mechanoreceptors and free nerve endings of adult rat periodontal ligament, dental pulp and skin. *Arch. Histol. Cytol.* 1996;59(3) 291–304.
- [40] Curtis R, Stewart HJ, Hall SM, Wilkin GP, Mirsky R, Jessen KR. GAP-43 is expressed by nonmyelin-forming Schwann cells of the peripheral nervous system. *J. Cell Biol.* 1992;116(6) 1455–1464.
- [41] Mani S, Shen Y, Schaefer J, Meiri KF. Failure to express GAP-43 during neurogenesis affects cell cycle regulation and differentiation of neural precursors and stimulates apoptosis of neurons. *Mol. Cell. Neurosci.* 2001;17(1) 54–66.

- [42] Ibarra A, Hernández E, Lomeli J, Pineda D, Buenrostro M, Martiñón S, Garcia E, Flores N, Guizar-Sahagun G, Correa D, Madrazo I. Cyclosporin-A enhances non-functional axonal growing after complete spinal cord transection. *Brain Res.* 2007;1149 200–209.
- [43] Byers MR, Maeda T, Brown AM, Westenbroek RE. GFAP immunoreactivity and transcription in trigeminal and dental tissues of rats and transgenic GFP/GFAP mice. *Microsc. Res. Tech.* 2004;65(6) 295–307.
- [44] Farahani RM, Sarrafpour B, Simonian M, Li Q, Hunter N. Directed glia-assisted angiogenesis in a mature neurosensory structure: pericytes mediate an adaptive response in human dental pulp that maintains blood-barrier function. *J. Comp. Neurol.* 2012;520(17) 3803–3826.
- [45] Kim HA, Mindos T, Parkinson DB. Plastic fantastic: Schwann cells and repair of the peripheral nervous system. *Stem Cells Transl. Med.* 2013;2(8) 553–557.
- [46] Jessen KR, Mirsky R. The origin and development of glial cells in peripheral nerves. *Nat. Rev. Neurosci.* 2005;6(9) 671–682.
- [47] Pereira JA, Lebrun-Julien F, Suter U. Molecular mechanisms regulating myelination in the peripheral nervous system. *Trends Neurosci.* 2012;35(2) 123–134.
- [48] Nait Lechguer A, Kuchler-Bopp S, Hu B, Haïkel Y, Lesot H. Vascularization of engineered teeth. *J. Dent. Res.* 2008;87(12) 1138–1143.
- [49] Yoshida S, Ohshima H. Distribution and organization of peripheral capillaries in dental pulp and their relationship to odontoblasts. *Anat. Rec.* 1996;245(2) 313–326.
- [50] Bishop MA. An investigation of pulp capillaries and tight junctions between odontoblasts in cats. *Anat. Embryol.* 1987;177(2) 131–138.
- [51] Tabata S, Ozaki HS, Nakashima M, Uemura M, Iwamoto H. Innervation of blood vessels in the rat incisor pulp: a scanning 1. electron microscopic and immunoelectron microscopic study. *Anat. Rec.* 1998;251(3) 384–391.
- [52] Shimeno Y, Sugawara Y, Iikubo M, Shoji N, Sasano T. Sympathetic nerve fibers sprout into rat odontoblast layer, but not into dentinal tubules, in response to cavity preparation. *Neurosci. Lett.* 2008;435(1) 73–77.
- [53] Corpron RE, Avery JK. The ultrastructure of intradental nerves in developing mouse molars. *Anat. Rec.* 1973;175(3) 585–606.
- [54] Rothová M, Feng J, Sharpe PT, Peterková R, Tucker AS. Contribution of mesoderm to the developing dental papilla. *Int. J. Dev. Biol.* 2011;55(1) 59–64.
- [55] Hirschi KK, D'Amore PA. Pericytes in the microvasculature. *Cardiovasc. Res.* 1996;32(4) 687–698.
- [56] Mendes LF, Pirraco RP, Szymczyk W, Frias AM, Santos TC, Reis RL, Marques AP. Perivascular-like cells contribute to the stability of the vascular network of osteogenic tissue formed from cell sheet-based constructs. *PLoS ONE.* 2012;7(7) e41051.
- [57] Tigges U, Welser-Alves JV, Boroujerdi A, Milner R. A novel and simple method for culturing pericytes from mouse brain. *Microvasc. Res.* 2012;84(1) 74–80.
- [58] Hamilton NB, Attwell D, Hall CN. Pericyte-mediated regulation of capillary diameter: a component of neurovascular coupling in health and disease. *Front. Neuroenergetics.* 2010;2.
- [59] Shi S, Gronthos S. Perivascular niche of postnatal mesenchymal stem cells in human bone marrow and dental pulp. *J. Bone Miner. Res.* 2003;18(4) 696–704.
- [60] Caplan AI. All MSCs are pericytes? *Cell Stem Cell.* 2008;3(3) 229–230.
- [61] Crisan M, Yap S, Casteilla L, Chen C-W, Corselli M, Park TS, Andriolo G, Sun B, Zheng B, Zhang L, Norotte C, Teng P-N, Traas J, Schugar R, Deasy BM, Badylak S, Buhring H-J, Giacobino J-P, Lazzari L, Huard J, Péault B. A perivascular origin for mesenchymal stem cells in multiple human organs. *Cell Stem Cell.* 2008;3(3) 301–313.

- [62] Feng J, Mantesso A, De Bari C, Nishiyama A, Sharpe PT. Dual origin of mesenchymal stem cells contributing to organ growth and repair. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2011;108(16) 6503–6508.
- [63] Zhang JQ, Nagata K, Iijima T. Scanning electron microscopy and immunohistochemical observations of the vascular nerve plexuses in the dental pulp of rat incisor. *Anat. Rec.* 1998;251(2) 214–220.
- [64] Iijima T, Zhang J-Q. Three-dimensional wall structure and the innervation of dental pulp blood vessels. *Microsc. Res. Tech.* 2002;56(1) 32–41.
- [65] Pohto P, Antila R. Innervation of blood vessels in the dental pulp. *Int. Dent. J.* 1972;22(2) 228–239.
- [66] Hildebrand C, Fried K, Tuisku F, Johansson CS. Teeth and tooth nerves. *Prog. Neurobiol.* 1995;45(3) 165–222.
- [67] Zhao H, Feng J, Seidel K, Shi S, Klein O, Sharpe P, Chai Y. Secretion of shh by a neurovascular bundle niche supports mesenchymal stem cell homeostasis in the adult mouse incisor. *Cell Stem Cell.* 2014;14(2) 160–173.
- [68] Ellis KM, O Carroll DC, Lewis MD, Rychkov GY, Koblar SA. Neurogenic potential of dental pulp stem cells isolated from murine incisors. *Stem Cell Res. Ther.* 2014;5(1) 30.
- [69] Higuchi K, Santiwong P, Tamaki H, Terashima T, Nakayama H, Notani T, Iseki H, Baba O, Takano Y. Development and terminal differentiation of pulp and periodontal nerve elements in subcutaneous transplants of molar tooth germs and incisors of the rat. *Eur. J. Oral Sci.* 2008;116(4) 324–333.
- [70] Bhatheja K, Field J. Schwann cells: origins and role in axonal maintenance and regeneration. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 2006;38(12) 1995–1999.
- [71] Woodhoo A, Sommer L. Development of the Schwann cell lineage: from the neural crest to the myelinated nerve. *Glia.* 2008 ;56(14) 1481–1490.
- [72] Martens W, Sanen K, Georgiou M, Struys T, Bronckaers A, Ameloot M, Phillips J, Lambrichts I. Human dental pulp stem cells can differentiate into Schwann cells and promote and guide neurite outgrowth in an aligned tissue-engineered collagen construct in vitro. *FASEB J.* 2014;28(4) 1634–1643.
- [73] Byers MR. Sensory innervation of periodontal ligament of rat molars consists of unencapsulated Ruffini-like mechanoreceptors and free nerve endings. *J. Comp. Neurol.* 1985;231(4) 500–518.
- [74] Maeda T, Ochi K, Nakakura-Ohshima K, Youn SH, Wakisaka S. The Ruffini ending as the primary mechanoreceptor in the periodontal ligament: its morphology, cytochemical features, regeneration, and development. *Crit. Rev. Oral Biol. Med.* 1999;10(3) 307–327.
- [75] Lungová V, Radlanski RJ, Tucker AS, Renz H, Mišek I, Matalová E. Tooth-bone morphogenesis during postnatal stages of mouse first molar development. *J. Anat.* 2011;218(6) 699–716.
- [76] Pearson AA. The early innervation of the developing deciduous teeth. *J. Anat.* 1977;123(Pt 3) 563–577.
- [77] Luukko K. Immunohistochemical localization of nerve fibres during development of embryonic rat molar using peripherin and protein gene product 9.5 antibodies. *Arch. Oral Biol.* 1997;42(3) 189–195.
- [78] Elefteriou F, Campbell P, Ma Y. Control of bone remodeling by the peripheral sympathetic nervous system. *Calcif. Tissue Int.* 2014;94(1) 140–151.
- [79] Kondo M, Kondo H, Miyazawa K, Goto S, Togari A. Experimental tooth movement-induced osteoclast activation is regulated by sympathetic signaling. *Bone.* 2013;52(1) 39–47.
- [80] Volponi AA, Pang Y, Sharpe PT. Stem cell-based biological tooth repair and regeneration. *Trends Cell Biol.* 2010;20(12) 715–722.
- [81] Dangaria SJ, Ito Y, Luan X, Diekwisch TGH. Successful periodontal ligament regeneration by periodontal progenitor preseeded on natural tooth root surfaces. *Stem Cells Dev.* 2011;20(10) 1659–1668.
- [82] Maeda H, Fujii S, Tomokiyo A, Wada N, Akamine A. Periodontal tissue engineering: defining the triad. *Int. J. Oral Maxillofac. Implants.* 2013;28(6) 461–471.

- [83] Han J, Menicanin D, Gronthos S, Bartold PM. Stem cells, tissue engineering and periodontal regeneration. *Aust. Dent. J.* 2014;59 (Suppl 1) 117–130.
- [84] Siemionow M, Gharb BB, Rampazzo A. Pathways of sensory recovery after face transplantation. *Plast. Reconstr. Surg.* 2011;127(5) 1875–1889.
- [85] Iohara K, Murakami M, Takeuchi N, Osako Y, Ito M, Ishizaka R, Utunomiya S, Nakamura H, Matsushita K, Nakashima M. A Novel Combinatorial Therapy With Pulp Stem Cells and Granulocyte Colony-Stimulating Factor for Total Pulp Regeneration. *Stem Cells Transl. Med.* 2013;2(10) 521–533.
- [86] Arthur A, Shi S, Zannettino ACW, Fujii N, Gronthos S, Koblar SA. Implanted adult human dental pulp stem cells induce endogenous axon guidance. *Stem Cells.* 2009;27(9) 2229–2237.
- [87] Nosrat IV, Widenfalk J, Olson L, Nosrat CA. Dental pulp cells produce neurotrophic factors, interact with trigeminal neurons in vitro, and rescue motoneurons after spinal cord injury. *Dev. Biol.* 2001;238(1) 120–132.
- [88] Nosrat IV, Smith CA, Mullally P, Olson L, Nosrat CA. Dental pulp cells provide neurotrophic support for dopaminergic neurons and differentiate into neurons in vitro; implications for tissue engineering and repair in the nervous system. *Eur. J. Neurosci.* 2004;19(9) 2388–2398.
- [89] Zhang W, Ge W, Li C, You S, Liao L, Han Q, Deng W, Zhao RCH. Effects of mesenchymal stem cells on differentiation, maturation, and function of human monocyte-derived dendritic cells. *Stem Cells Dev.* 2004;13(3) 263–271.
- [90] Liu Y, Wang S, Shi S. The role of recipient T cells in mesenchymal stem cell-based tissue regeneration. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 2012;44(11) 2044–2050.
- [91] Bernardo ME, Fibbe WE. Mesenchymal stromal cells: sensors and switchers of inflammation. *Cell Stem Cell.* 2013;13(4) 392–402.
- [92] Wada N, Menicanin D, Shi S, Bartold PM, Gronthos S. Immunomodulatory properties of human periodontal ligament stem cells. *J. Cell. Physiol.* 2009;219(3) 667–676.
- [93] Wada N, Gronthos S, Bartold PM. Immunomodulatory effects of stem cells. *Periodontol.* 2000. 2013;63(1) 198–216.
- [94] Yamaza T, Kentaro A, Chen C, Liu Y, Shi Y, Gronthos S, Wang S, Shi S. Immunomodulatory properties of stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *Stem Cell Res. Ther.* 2010;1(1) 5.
- [95] Zhao Y, Wang L, Jin Y, Shi S. Fas ligand regulates the immunomodulatory properties of dental pulp stem cells. *J. Dent. Res.* 2012;91(10) 948–954.
- [96] Feng J, Mantesso A, Sharpe PT. Perivascular cells as mesenchymal stem cells. *Expert Opin. Biol. Ther.* 2010;10(10) 1441–1451.
- [97] Mahmood A, Wu H, Qu C, Xiong Y, Chopp M. Effects of treating traumatic brain injury with collagen scaffolds and human bone marrow stromal cells on sprouting of corticospinal tract axons into the denervated side of the spinal cord. *J. Neurosurg.* 2013;118(2) 381–389.
- [98] Uccelli A, Pistoia V, Moretta L. Mesenchymal stem cells: a new strategy for immunosuppression? *Trends Immunol.* 2007;28(5) 219–226.
- [99] Ramasamy R, Fazekasova H, Lam EW-F, Soeiro I, Lombardi G, Dazzi F. Mesenchymal stem cells inhibit dendritic cell differentiation and function by preventing entry into the cell cycle. *Transplantation.* 2007;83(1) 71–76.
- [100] Miranda CO, Teixeira CA, Sousa VF, Santos TE, Liz MA, Marques AM, Pinto-do-Ó P, Sousa MM. Primary bone marrow mesenchymal stromal cells rescue the axonal phenotype of Twitcher mice. *Cell Transplant.* 2014;23(2) 239–252.
- [101] Ball LM, Bernardo ME, Roelofs H, Lankester A, Cometa A, Egeler RM, Locatelli F, Fibbe WE. Cotransplantation of ex vivo expanded mesenchymal stem cells accelerates lymphocyte recovery and may reduce the risk of graft failure in haploidentical hematopoietic stem-cell transplantation. *Blood.* 2007;110(7) 2764–2767.
- [102] Honda MJ, Ohara T, Sumita Y, Ogaeri T, Kagami H, Ueda M. Preliminary study of tissue-engineered odontogenesis in the canine jaw. *J. Oral Maxillofac. Surg.* 2006;64(2) 283–289.



- [103] Huang GT, 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.
- [104] Keller L, Kuchler-Bopp S, Mendoza SA, Poliard A, Lesot H. Tooth engineering: searching for dental mesenchymal cells sources. *Front Physiol.* 2011;2 7.
- [105] Mina M, Kollar EJ. The induction of odontogenesis in non-dental mesenchyme combined with early murine mandibular arch epithelium. *Arch. Oral Biol.* 1987;32(2) 123–127.
- [106] Smith AJ, Lesot H. Induction and regulation of crown dentinogenesis: embryonic events as a template for dental tissue repair? *Crit. Rev. Oral Biol. Med.* 2001;12(5) 425–437.
- [107] Nakagawa E, Itoh T, Yoshie H, Satokata I. Odontogenic potential of post-natal oral mucosal epithelium. *J. Dent. Res.* 2009;88(3) 219–223.
- [108] Takahashi C, Yoshida H, Komine A, Nakao K, Tsuji T, Tomooka Y. Newly established cell lines from mouse oral epithelium regenerate teeth when combined with dental mesenchyme. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Anim.* 2010;46(5) 457–468.
- [109] Wang B, Li L, Du S, Liu C, Lin X, Chen Y, Zhang Y. Induction of human keratinocytes into enamel-secreting ameloblasts. *Dev. Biol.* 2010;344(2) 795–799.

---

## **PARTIE 5**

# **DISCUSSION ET PERSPECTIVES**

---

L'émergence de la médecine régénérative et plus particulièrement de l'ingénierie tissulaire a apporté de nouveaux développements dans la recherche en odontologie. Actuellement, de nombreuses équipes de recherche odontologique s'orientent vers l'ingénierie tissulaire dentaire. Des approches complémentaires se sont développées dans le monde entier afin de reconstituer soit des tissus dentaires (Honda et al., 2010; Huang, 2011), soit l'organe dentaire dans son intégralité (Yen and Sharpe, 2008; Honda et al., 2008; Kuchler-Bopp et al., 2011; Keller et al., 2013). Dans le cas de la régénération de l'organe dentaire entier, certains paramètres ont une importance particulière comme : 1) une minéralisation correcte des matrices avec une bonne qualité de l'interface dentine/émail ; 2) le développement des racines et du parodonte permettant l'ancrage de la dent à l'os alvéolaire ; 3) et enfin la vascularisation et l'innervation, nécessaire à la fonctionnalité de l'organe.

Par une approche basée sur la biomimétique et l'utilisation des cellules embryonnaires dentaires, notre équipe a développé une stratégie d'ingénierie de l'organe dentaire. A partir de réassociations cellulaires, notre méthode permet d'obtenir, en deux étapes, un organe dentaire dans son intégralité (Keller et al., 2014). Une première étape *in vitro* aboutit à la formation de la couronne dentaire avec une phase d'histogenèse épithéliale bien engagée. Durant cette étape, la phase des cytodifférenciations a également débuté avec la présence d'odontoblastes au contact de pré-améloblastes. Enfin, des cuspides se forment en fonction du nombre de cellules mésenchymateuses réassociées (Hu et al., 2005a; b). La deuxième étape *in vivo* permet d'initier le développement des racines et du parodonte (Hu et al., 2006a; Keller et al., 2014). Au cours de cette étape, la vascularisation du mésenchyme dentaire se met en place à partir de l'hôte et permet la croissance de la dent et la minéralisation des matrices (Nait Lechguer et al., 2008; 2011). Notre méthode permet donc d'obtenir une dent dans son intégralité si on raisonne en termes d'histogenèse ou de différenciations fonctionnelles (sécrétion de dentine, d'émail et de ciment). Pour autant, nous ne savons pas contrôler la forme, ni la taille des dents obtenues. Certains laboratoires s'intéressent d'avantage à ces critères et utilisent pour cela des biomatériaux (ou « scaffold ») pour guider la croissance de l'organe dentaire (Ohara et al., 2010; Zhang et al., 2010). Cependant, l'utilisation de « scaffolds » peut interférer avec les interactions épithélio-mésenchymateuses et ainsi perturber le développement de la dent (Kuchler-Bopp et al., 2011; Keller et al., 2014). Nous pouvons le constater sur la figure 1 de Young *et coll.*, (2005) où la forme de la dent est correcte mais les tissus dentaires sont complètement désorganisés.

Les dents obtenues par notre approche expérimentale, répondent à une grande majorité des critères cités précédemment. Cependant pour compléter ce panel, nous avons cherché à reproduire l'innervation du mésenchyme dentaire qui semble être indispensable. En effet, les fibres nerveuses de la pulpe dentaire participent à la régulation du flux sanguin, de l'inflammation *via* des interactions avec les cellules du système immunitaire, à la détection d'un stress (mécanique, chimique ou thermique) et au maintien de l'homéostasie pulpaire (Hildebrand et al., 1995; Byers and Närhi, 1999; Olgart, 1996; Byers et al., 2003). L'association des fibres nerveuses avec les vaisseaux sanguins participe à l'homéostasie de la pulpe dentaire (Nakashima and Akamine, 2005). De nombreuses études ont montré que ces complexes neuro-vasculaires représentent des « niches » pour les cellules souches au sein de la pulpe des dents matures (Shi and Gronthos, 2003; Arthur et al., 2008; Zhao et al., 2014). Ces cellules souches sont en partie originaires de la crête neurale (Arthur et al., 2008). Les cellules souches pulpaires sont isolées chez l'homme, à l'aide d'un anticorps dirigé contre l'antigène STRO-1 et se caractérisent par l'expression de marqueurs spécifiques des cellules souches mésenchymateuses : CD29, CD44, CD105, CD166 positives et CD34, CD45 négatives (Nakashima et al., 2009). Miura *et coll.*, (2003) ont montré qu'elles exprimaient également des marqueurs spécifiques des cellules nerveuses : nestine,  $\beta$ III-tubuline, protéine acide fibrillaire gliale (GFAP), acide glutamique décarboxylase (GAD), neurofilament M (NFM),... D'autres équipes suggèrent que ces cellules ont des potentialités neurogéniques et qu'elles peuvent ainsi se différencier en neurones fonctionnels dans certaines conditions environnementales (Arthur et al., 2008; Nakashima et al., 2009; Brar and Toor, 2012; Ellis et al., 2014).

### **Les réassociations cellulaires implantées en sous-cutané ne sont pas innervées spontanément**

Lorsque nous avons implanté nos réassociations cellulaires en sous-cutané chez la souris adulte, aucune fibre nerveuse n'a été observée au sein de l'implant (Kökten et al., 2014). Le même résultat avait été obtenu après l'implantation d'une dent post-natale de 4 jours (PN4) (Keller et al., 2013). Ces résultats montrent que dans nos conditions expérimentales, les cellules embryonnaires et éventuellement les cellules souches présentes dans la pulpe dentaire à PN4, n'ont pas les signaux nécessaires ou la potentialité pour se



différencier en cellules nerveuses. Contrairement à ce que l'on observe pour la vascularisation, l'hôte ne participe pas à l'innervation de nos implants.

Notre équipe a tenté de pallier ce problème par un apport nerveux exogène. Ainsi, des expériences de co-implantations de réassociations cellulaires avec un ganglion dorsal rachidien (DRG) ont été réalisées en sous-cutané chez la souris adulte (Kuchler-Bopp et al., 2011). Le DRG est un ganglion nerveux situé sur la racine dorsale du nerf rachidien. Il permet de relier cette racine dorsale à la moelle épinière. Il est constitué essentiellement de fibres nerveuses sensibles afférentes, c'est-à-dire des nerfs qui vont relayer l'information sensorielle au système nerveux central (Zuchero, 2014). Li *et coll.*, (2007) ont montré que des cellules souches issues de la crête neurale étaient présentes au sein de ce ganglion et qu'elles étaient capables de se différencier en neurones dans certaines conditions. D'autres équipes ont mis en évidence la grande plasticité et la capacité du DRG à se régénérer après une lésion chirurgicale (Groves et al., 2003; Guseva and Chelyshev, 2006). Alors que ce ganglion nerveux n'a pas permis d'innervier la pulpe des réassociations cellulaires implantées, des fibres nerveuses ont été détectées dans les tissus périphériques des implants (Kuchler-Bopp et al., 2011). Ainsi, avec un apport nerveux, il doit être possible de contourner la non-participation de l'hôte à l'innervation de nos implants tel qu'on l'observe dans nos conditions expérimentales. L'absence de fibres nerveuses dans la pulpe dentaire pourrait être due au fait que le DRG n'est pas le ganglion nerveux qui innerve physiologiquement les molaires.

Pour tester cette hypothèse, nous avons repris les expériences en utilisant le ganglion trigéminal (TG). En effet, *via* les nerfs maxillaire et mandibulaire, ce ganglion est responsable de l'innervation physiologique des dents. Comme le DRG, le TG est un ganglion nerveux sensitif (Darian-Smith, 1973). Il contient également des cellules souches, issues de la crête neurale, et capables de se différencier en neurones (Lagares et al., 2007). Néanmoins, nous avons obtenu le même résultat qu'avec le DRG lorsque nous avons co-implanté nos réassociations cellulaires avec un TG en sous-cutané (Kökten et al., 2014 ; Keller et al., 2014). En effet, nous avons observé la présence de fibres nerveuses uniquement au niveau du mésenchyme péri-dentaire (Kökten et al., 2014). Par endroit, ces fibres nerveuses sont relativement proches des vaisseaux sanguins mais aucune association neuro-vasculaire n'a été observée (Kökten et al., in press). Alors que les vaisseaux sanguins pénètrent dans la pulpe dentaire de nos implants, il existe probablement une contrainte spécifique qui empêche l'entrée des fibres nerveuses dans le mésenchyme dentaire (Kökten et al., 2014 ; Keller et al., 2014). Cette hypothèse est corroborée par des observations antérieures. En effet, il avait été

montré qu'après deux semaines d'implantation, les dents obtenues étaient similaires à une molaire physiologique à PN4 du point de vue de la sécrétion et de la minéralisation des matrices (Nait Lechguer et al., 2011). Or, à ce stade, les fibres nerveuses devraient être présentes dans la pulpe dentaire (Kökten et al., 2014 ; Keller et al., 2014). De plus, Mohamed et Atkinson, (1983) ont montré que les fibres nerveuses entrent dans le mésenchyme dentaire qu'à partir du moment où une couche d'émail est déposée.

### **Stimulation de la croissance axonale par immuno-modulation**

Différentes équipes ont démontré que le TG possède une grande plasticité et capacité de régénération (Holland, 1996; Páli and Négyessy, 2002). Cependant, à la suite d'une lésion, le nerf trigéminal ne se régénère pas entièrement, ce qui entraîne des conséquences sévères comme : une perte persistante de la sensibilité, la présence de douleurs chroniques et des dysfonctionnements au niveau des tissus cibles (Pan et al., 2013). De ce fait, il est possible que l'étape de prélèvement du TG perturbe la croissance axonale et limite ainsi l'innervation de la pulpe dentaire. Toutefois, il existe différentes méthodes pour rétablir une régénération nerveuse complète et restaurer la fonction sensorielle. Des auteurs ont montré qu'une application exogène de VEGF au niveau de la greffe permettait d'accélérer la régénération neuronale et de restaurer complètement la fonction sensorielle (Widenfalk et al., 2003). Des résultats similaires ont été obtenus en augmentant l'expression de ce facteur de croissance par thérapie génique (Schratzberger et al., 2001). En effet, les axones du TG expriment des récepteurs du VEGF comme : VEGF-R1, VEGF-R2 et le récepteur spécifique de la neuropiline qui est également un co-récepteur du VEGF-R2 (Neufeld et al., 1999). Ainsi, par le biais de ces récepteurs, au niveau des complexes neuro-vasculaires, le VEGF va permettre la croissance simultanée des vaisseaux et des nerfs (Lok et al., 2007; Pan et al., 2013). La thérapie immunosuppressive représente une autre alternative pour améliorer la ré-innervation des tissus transplantés (Siemionow et al., 2011). Pour cela, divers médicaments peuvent être utilisés : anticorps monoclonaux (basiliximab, daclizumab), agents anti-prolifératifs (azathioprine, mycophenolate mofetil), cortico-stéroïdes (methylprednisolone, prednisolone) ou des inhibiteurs de la calcineurine (**cyclosporine A**, tacrolimus) (Gorantla et al., 2000; Klimczak and Siemionow, 2007). Parmi ces substances, nous avons choisi la cyclosporine A (CsA) pour ses propriétés immunosuppressives favorisant la ré-innervation des tissus transplantés (Siemionow et al., 2011). En effet, cette molécule approuvée par la FDA (Food

and Drug Administration) depuis 1983 avait initialement été développée pour prévenir le rejet de greffe (Gorantla et al., 2000). La CsA inhibe l'activation et la prolifération des lymphocytes T effecteurs (LT-auxiliaires CD4<sup>+</sup> et LT-cytotoxiques CD8<sup>+</sup>), également présents dans une pulpe dentaire saine, par deux mécanismes distincts. D'une part, la CsA interagit avec la cyclophiline de ces cellules pour constituer le complexe cyclosporine-cyclophiline. Ce complexe inhibe l'activité de la calcineurine et ainsi diminue la sécrétion de l'interleukine-2 (IL-2) principalement mais aussi d'autres cytokines pro-inflammatoires (Jontell et al., 1987; Gorantla et al., 2000; Miroux et al., 2012). Et d'autre part, elle augmente la transcription de TGF- $\beta$ 1 au niveau des LT IL-2 dépendants (Shin et al., 1998; Brabletz et al., 1993). Cette inhibition lymphocytaire favorise la régénération axonale (Serpe et al., 2003; Pool et al., 2012).

Ainsi, en traitant nos souris à la CsA, nous avons espéré obtenir l'innervation de la pulpe dentaire de nos réassociations cellulaires implantées en présence d'un TG. Déjà après une semaine d'implantation, nous avons constaté la présence d'axones provenant du TG au sein du mésenchyme péri-dentaire et de la pulpe dentaire de nos implants. A ce stade, les axones atteignent les odontoblastes. Ce résultat a été maintenu après deux semaines d'implantation (Kökten et al., 2014). Cependant, Descazeaud *et coll.*, (2012) ont montré que la calcineurine était impliquée dans l'organisation du cytosquelette. De plus, la calcineurine est fortement exprimée dans les odontoblastes et améloblastes sécréteurs, ce qui suggère qu'elle peut aussi être impliquée dans la minéralisation des matrices (Oshima and Watanabe, 2012). Malgré son inhibition, nous n'avons pas observé d'effet négatif de la CsA sur l'organisation du cytosquelette ni sur la sécrétion ou la minéralisation des matrices (Kökten et al., 2014). Nous pouvons donc suggérer que la CsA agit spécifiquement sur les LT effecteurs (Gorantla et al., 2000).

### **Le système immunitaire dans l'innervation dentaire**

En plus de son effet immunosuppresseur *via* son action sur les LT, la CsA peut aussi stimuler la croissance axonale *via* son action sur les cônes de croissance (Wen et al., 2004). Les axones de la pulpe dentaire expriment fortement la GAP-43 (Growth Associated Protein-43) (Fried and Risling, 1992; Byers et al., 2003). La CsA augmente l'expression de GAP-43 dans les cônes de croissance et peut ainsi stimuler la régénération et la croissance axonale (voir Figure S2 Kökten et al., 2014).

Pour lever cette ambiguïté, nous avons co-implanté nos réassociations cellulaires avec un TG en sous-cutané chez des souris immuno-déficientes (Nude) (Kökten et al., 2014). Ainsi, nous pouvions voir si l'immuno-suppression était suffisante pour permettre l'innervation de la pulpe dentaire de nos implants. Après une semaine d'implantation, nous avons constaté la présence de fibres nerveuses dans le mésenchyme péri-dentaire et la pulpe dentaire des implants. Cependant à ce stade, contrairement à ce qui a été observé dans le cas du traitement à la CsA, les fibres nerveuses n'atteignent pas encore la couche odontoblastique (Kökten et al., 2014). Cette différence de cinétique est probablement due à l'effet stimulant de la CsA sur la croissance axonale. Pour autant, après deux semaines d'implantation, l'innervation de nos implants était identique dans les deux cas. De plus, nous avons remarqué un pourcentage de dents innervées similaire après implantation de réassociations cellulaires chez les souris ICR traitées à la CsA et chez les souris Nude. Ainsi, nous pouvons suggérer que l'immunosuppression est nécessaire et suffisante pour l'innervation de nos réassociations cellulaires implantées (Kökten et al., 2014).

### **Relations cellulaires dans les tissus dentaires**

Dans tous les cas, après deux semaines d'implantation, les fibres nerveuses atteignent les odontoblastes. Toutefois, nous n'avons pas observé de fibres nerveuses dans les tubules dentinaires (Kökten et al., 2014 ; Kökten et al., in press). Nagahama *et coll.*, (1998) ont montré que l'innervation de la dentine chez la souris se développe après l'éruption de la dent à PN20. De plus, selon Egan *et coll.*, (1999) les fibres nerveuses terminent leur croissance dans la couche odontoblastique chez l'homme et une très faible proportion pénètre dans la dentine. Nous avons observé des jonctions entre les axones et les odontoblastes (Kökten et al., in press). Magloire *et coll.*, (2010) ont montré que dans la couche odontoblastique, les axones forment des complexes mécano-sensoriels avec les odontoblastes. Cependant, la nature des signaux échangés entre ces deux types cellulaires n'a pas encore été élucidée.

En fonction de leur degré de maturation, on distingue deux types de vaisseaux sanguins au sein de la pulpe dentaire et des odontoblastes. Des vaisseaux immatures positifs aux anticorps anti-CD34 (marqueur endothélial) et anti-CD31 (marqueur endothélial) et matures entourés de péricytes, positifs aux anticorps anti-CD146 (marqueur endothélial et des péricytes) et anti- $\alpha$ SMA (marqueur des péricytes) (Kökten et al., 2014 ; Kökten et al., in press). Les péricytes sont impliqués dans le développement, le remodelage, la stabilisation et

la maturation vasculaire (Hirschi and D'Amore, 1996; Mendes et al., 2012). Nous avons observé, quel que soit le degré de maturation des vaisseaux, des complexes neuro-vasculaires au sein de la pulpe dentaire et de la couche odontoblastique (Kökten et al., 2014 ; Kökten et al., in press). Ces complexes pourraient être impliqués dans la croissance axonale, comme cela a été décrit dans d'autres modèles (Lok et al., 2007; Pan et al., 2013). Il a été montré qu'au niveau des odontoblastes, les vaisseaux sanguins sont impliqués dans la minéralisation de la dentine (Bishop, 1987; Yoshida and Ohshima, 1996). Par ailleurs, nous avons remarqué par microscopie électronique à transmission (MET), des contacts entre les axones et les cellules endothéliales (Kökten et al., in press). Ces contacts sont impliqués dans la régulation du flux sanguin par les axones (Olgart, 1996). En effet, des substances vasoactives sont transmises de l'axone vers la cellule endothéliale *via* ces contacts (Arneric et al., 1988). Le même mécanisme a été décrit entre les axones et les péricytes (Roufail et al., 1995; Cauli et al., 2004). Ainsi, les péricytes par leur fonction contractile, contribuent également à la régulation du flux sanguins (Hamilton et al., 2010). Il a été décrit dans la littérature, que dans la pulpe dentaire, les vaisseaux sanguins sont innervés par des fibres nerveuses sensorielles et sympathiques (Pohto and Antila, 1972; Hildebrand et al., 1995). Moe *et coll.*, (2008) ont montré qu'au cours du développement, les fibres nerveuses sensorielles entrent dans la pulpe dentaire aux stades PN3-4 alors que les fibres sympathiques entrent au stade PN9. Après deux semaines d'implantation, l'innervation de nos implants est similaire à celle d'une molaire physiologique au stade PN7 (Kökten et al., 2014 ; Kökten et al., in press), il est donc fort probable que les fibres nerveuses observées dans la pulpe dentaire sont uniquement sensorielles. L'origine trigéminal des fibres sensorielles et l'origine cervicale des fibres sympathiques renforcent cette suggestion (Darian-Smith, 1973; Moe et al., 2008).

Par ailleurs, nous avons mis en évidence la présence de deux types de cellules gliales au niveau du mésenchyme péri-dentaire, de la pulpe dentaire et des odontoblastes (Kökten et al., 2014 ; Kökten et al., in press).

D'une part, nous avons observé la présence de cellules gliales satellites (CGS) (Kökten et al., in press). Ces cellules ont une morphologie et une fonction analogues à celles des astrocytes que l'on peut retrouver dans le système nerveux central (Hanani, 2005). Comme leurs homologues, elles expriment la GFAP et c'est pour cette raison, que pendant de nombreuses années, les CGS et les astrocytes ont été confondus (Chudler et al., 1997; Byers et al., 2004; Hanani, 2005) alors que, contrairement aux astrocytes, les CGS sont présentes dans un milieu où le tissu non-neuronal abonde (Pannese, 1981). Dans les trois compartiments



dentaires cités précédemment, nous avons remarqué que les CGS sont associées aux axones (Kökten et al., in press). Hanani *et coll.*, (2002) ont montré que, dans les conditions physiologiques, les CGS présentaient une association limitée avec les axones. Cependant, il a été observé qu'une lésion du nerf alvéolaire inférieur induit une augmentation du nombre de cellules GFAP<sup>+</sup> autour des axones (Chudler et al., 1997). De même, une autre étude a montré qu'une lésion nerveuse renforce l'association des CGS aux axones par la mise en place de jonctions de type « gap » (Hanani et al., 2002). Stephenson et Byers, (1995) suggèrent la présence d'une communication cellulaire entre les CGS et les axones. En effet, des études ont montré que les CGS sécrètent de nombreuses cytokines et des facteurs de croissance tels que les neurotrophines pour favoriser la survie et la régénération axonale (Ridet et al., 1997; Pastor et al., 2000). Dans notre modèle, nous pouvons suggérer que le prélèvement du TG favorise la prolifération des CGS, et ainsi, ces cellules doivent probablement participer à la régénération et/ou la croissance des axones du TG.

Nous avons également mis en évidence une relation étroite entre CGS et vaisseaux sanguins, quel que soit leur degré de maturation (Kökten et al., in press). Il a été montré au niveau du cerveau que leurs homologues (les astrocytes) contribuent à la régulation du flux sanguin (Watkins et al., 2014). Il est probable que les CGS ont la même fonction au niveau du système nerveux périphérique. Ainsi, nous pouvons suggérer que l'association entre CGS et vaisseaux sanguins dans nos implants pourrait contribuer à la régulation du flux sanguin.

D'autre part, nous avons observé la présence de cellule de Schwann (CS) (Kökten et al., 2014; Kökten et al., in press). Ces cellules sont originaires de la crête neurale (Bronner-Fraser, 1993; Le Douarin et al., 1991). En effet, certaines cellules de la crête neurale vont se différencier en précurseurs de cellules de Schwann. Ces précurseurs vont ensuite se différencier en CS immatures qui donneront les CS matures myélinisées ou non-myélinisées (Mirsky et al., 2002). La maturation des CS évolue en parallèle avec la croissance des axones avec lesquels elles sont en contact (Jessen and Mirsky, 1998). Dans nos implants, ces cellules sont positives à l'anticorps dirigé contre l'antigène S100 $\beta$  (Kökten et al., 2014; Kökten et al., in press). Ce marqueur est spécifique des cellules de Schwann matures (Jessen and Mirsky, 1999). Ce résultat suggère qu'au niveau des trois compartiments cités précédemment, les axones sont en pleine croissance mais aussi que des interactions s'établissent entre ces axones et les CS. Différentes équipes ont montré que les CS sont impliquées dans la régulation de la structure et de la fonction axonales (Jessen and Mirsky, 1999) ainsi que dans la survie et la régénération des axones (Bhatheja and Field, 2006). Pour autant, nous avons observé dans le

cas de nos implantations chez la souris ICR adulte, des cellules S100 $\beta$  positives au sein de la pulpe dentaire malgré l'absence d'axones (Kökten et al., in press). Il a été montré que les CS peuvent survivre sans les axones par stimulation autocrine. En effet après une lésion nerveuse, la présence de ces cellules dans le tissu non innervé constitue un environnement favorable à la régénération axonale (Jessen and Mirsky, 1999; Mirsky et al., 2002). Cependant, nous ne connaissons pas l'origine de ces CS S100 $\beta$  positives observées dans la pulpe des implants chez les souris ICR. Elles pourraient provenir du TG et entrer dans la pulpe indépendamment des axones. Pour le vérifier, il serait nécessaire de réaliser des co-implantations de réassociations cellulaires avec des TG GFP<sup>+</sup>. Cette question pourrait être aussi abordée en recherchant la présence de CS S100 $\beta$  positives dans la pulpe de dents prélevées à PN2, c'est-à-dire avant que la pulpe soit innervée.

On sait par ailleurs que les CS sont impliquées dans la myélinisation des axones qu'elles entourent (Jessen and Mirsky, 1992; Morton et al., 2013). Pour autant, malgré la présence des deux types d'axones (myélinisés et non-myélinisés) dans le TG et la présence de ces cellules gliales au sein de nos implants, nous n'avons pas observé d'axones myélinisés, ni dans la pulpe dentaire et ni dans la couche odontoblastique (Kökten et al., 2014; Kökten et al., in press). Il a été montré qu'une lésion nerveuse induit une diminution du nombre et du diamètre des axones myélinisés. Cette diminution du diamètre des axones engendre leur démyélinisation (Gutmann and Sanders, 1943; Basbaum et al., 1991; Bhatheja and Field, 2006). Dans nos conditions expérimentales, le prélèvement du TG enclenche probablement ce processus et ainsi, nous pouvons supposer que les axones qui innervent la pulpe dentaire de nos implants sont de petit diamètre et donc dépourvus de myéline. Par ailleurs, la myélinisation axonale étant un processus lent et progressif (Mirsky et al., 2002), il est possible que la durée de l'implantation ne soit pas suffisante pour permettre la re-myélinisation des axones.

Nous avons également mis en évidence une relation étroite entre les CS et les vaisseaux sanguins, quel que soit leur degré de maturation. (Kökten et al., in press). Ces interactions entre cellules S100 $\beta$ <sup>+</sup> et vaisseaux sanguins ont aussi été décrites dans la pulpe dentaire chez l'homme (Farahani et al., 2011). De plus, dans le système nerveux périphérique, les CS sont capables de sécréter des facteurs de croissance comme le VEGF pour favoriser l'angiogenèse et ainsi attirer les vaisseaux le long des axones (Mukouyama et al., 2002;

Carmeliet, 2003). Afin d'évaluer cette fonction dans notre modèle, il serait intéressant de rechercher et éventuellement doser cette protéine dans nos implants innervés et non innervés.

### **Intérêt et possibilité d'une implantation mandibulaire**

Par ces résultats, nous avons montré que dans notre approche expérimentale (implantation en sous-cutané), l'innervation du mésenchyme dentaire ne se fait pas sans apport nerveux exogène. Le travail à suivre visera à obtenir une innervation venant de l'hôte, comme pour la vascularisation. Les résultats obtenus ici, après implantation sous-cutanée ne préjugent pas de la situation après implantation dans la mâchoire. Récemment, des auteurs ont montré le développement d'une dent après implantation de réassociations cellulaires dans l'os alvéolaire mandibulaire (Oshima et al., 2011). Leur stratégie d'ingénierie dentaire est similaire à la nôtre. En effet, ils obtiennent le développement d'une dent à partir de réassociations cellulaires embryonnaires dentaires. Après 5 jours de culture *in vitro*, ils implantent leurs réassociations cellulaires dans la capsule surrénale pendant 60 jours. Ils obtiennent ainsi le développement d'une dent intégrale enchâssée dans de l'os alvéolaire. Après cette première étape, les dents formées ont été ré-implantées pendant 40 jours dans la mandibule après extraction d'une molaire. Dans ces conditions, il semble être possible d'obtenir la vascularisation et l'innervation spontanées de la pulpe dentaire (Oshima et al., 2011). Cependant, l'origine des vaisseaux sanguins et des fibres nerveuses n'a pas été démontrée. Comme le même groupe l'avait montré dans des travaux précédents, la vascularisation se met probablement en place lors de l'implantation dans la capsule surrénale (Nakao et al., 2007). Cependant, il est peu probable que les vaisseaux sanguins observés après l'implantation mandibulaire soient des vestiges des vaisseaux déjà présents après implantation dans la capsule surrénale. La formation de nouveaux vaisseaux après implantation dans la mâchoire semble plus plausible. En effet, les vaisseaux mis en place dans la capsule surrénale doivent sûrement dégénérer au cours de l'implantation mandibulaire. Les fibres nerveuses, quant à elles, proviennent probablement du nerf alvéolaire inférieur puisqu'aucune innervation n'a été observée durant la première implantation (Nakao et al., 2007). Si tel est le cas, ce résultat est encourageant pour nos futures expériences. En effet, si le nerf alvéolaire est capable d'innover spontanément les réassociations cellulaires implantées, nous pourrions nous acquitter d'un apport nerveux exogène et imaginer une innervation par des nerfs à la fois sensoriels et sympathiques. Toutefois, une implantation dans la mandibule nécessite de surmonter certaines difficultés techniques. Après l'étape de culture *in vitro*, nos échantillons sont sphériques (Kökten et al., in press), l'orientation de la dent (racine vers le bas) dans l'os

alvéolaire sera donc compliquée à réaliser (Honda et al., 2006). Des résultats préliminaires obtenus au laboratoire reflètent cette difficulté (Nait Lechguer et al., 2008). Par ailleurs, Oshima *et coll.*, (2011) ont une durée d'implantation totale (capsule surrénale et mandibulaire) de 100 jours. Dans nos conditions expérimentales, nous n'arrivons pas à implanter au-delà de 15 jours chez les souris ICR. Cependant, lorsque l'on s'intéresse en détail à leur méthodologie, on remarque que ces auteurs traitent aussi leurs souris à la CsA (Nakao et al., 2007; Oshima et al., 2011). Un traitement immuno-modulateur doit donc être indispensable à une durée d'implantation aussi longue. Finalement, nous pouvons ainsi constater que l'immunodépression, induite par la CsA, pourrait aussi expliquer l'obtention de l'innervation des réassociations cellulaires implantées.

### **Intérêt des cellules souches pour l'innervation des réassociations dentaires**

L'utilisation de la CsA constitue un traitement lourd. De plus, les effets secondaires de ce médicament ne sont pas négligeables. En effet, un traitement à long terme induit une insuffisance rénale fonctionnelle, du diabète, de l'hypertension ou encore des maladies cardiovasculaires comme l'athérosclérose (Olyaei et al., 2001; Montori et al., 2002; Robert et al., 2010; Kockx et al., 2010).

Pour ces raisons, nous nous sommes orientés vers l'utilisation de cellules souches. Effectivement, il a été montré que les cellules souches pouvaient faciliter l'innervation de la pulpe dentaire par chemoattraction (Arthur et al., 2009). D'autre part, les cellules souches mésenchymateuses (CSM) en général possèdent des propriétés immuno-modulatrices par inhibition des deux systèmes immunitaires (inné et acquis). En effet, ces cellules sont capables de sécréter différentes cytokines (IFN $\gamma$ , IL-6, IL-10, NO, TGF $\beta$ , ...) et ainsi bloquer l'activité des LT, LB, des cellules dendritiques, des cellules NK et des monocytes/macrophages (Zhang et al., 2004; Liu et al., 2012; Bernardo and Fibbe, 2013). Des propriétés similaires ont été décrites pour les CSM dentaires et péri-dentaires (Wada et al., 2009; Yamaza et al., 2010; Zhao et al., 2012; Wada et al., 2013), ou même issues de la moelle osseuse (Uccelli et al., 2007; Ramasamy et al., 2007). En ce qui concerne les CSM de la moelle osseuse, il a été montré qu'en plus de leurs propriétés immuno-modulatrices, ces cellules étaient capables de stimuler la croissance axonale en sécrétant des facteurs neurotrophiques tels que le NGF (Nerve Growth Factor) et le BDNF (Brain-Derived Neurotrophic Factor) (Miranda et al., 2014). De plus, ces cellules stimulent également la

sécrétion du BDNF par les cellules de Schwann (Miranda et al., 2014). Nous avons donc voulu tester les propriétés de ces cellules dans notre modèle. Pour cela, de façon préliminaire, nous avons réalisé des réassociations cellulaires entre un épithélium dentaire intact et un mélange de cellules mésenchymateuses dentaires et de cellules dérivées de la moelle osseuse (CDMO) en proportion 50 : 50 (Kökten et al., in press). Après l'étape de culture *in vitro*, nous avons observé le développement d'une couronne dentaire avec une initiation de la phase des cytodifférenciations (présence d'odontoblastes et d'améloblastes). Après la co-implantation de ces réassociations avec un TG en sous-cutané chez la souris ICR, nous avons observé une initiation du développement radiculaire ainsi qu'une vascularisation et une innervation du mésenchyme péri-dentaire et de la pulpe dentaire (Kökten et al., in press). Même si les fibres nerveuses n'atteignaient pas les odontoblastes (Kökten et al., in press), ces premiers résultats montrent que les CDMO favorisent l'innervation de nos implants, en accord avec la littérature (Miranda et al., 2014). Il conviendra de poursuivre ce travail pour chercher à savoir si cet effet des CDMO fait bien intervenir des phénomènes d'immuno-modulation.

### **Intérêt des cellules souches pour l'ingénierie dentaire**

Aujourd'hui le challenge majeur de l'ingénierie de l'organe dentaire reste le remplacement des cellules dentaires embryonnaires par des cellules souches adultes non dentaires (Kuchler-Bopp et al., 2011; Volponi et al., 2010). Dans ce but, plusieurs laboratoires ont testé diverses cellules souches. Parmi ces cellules, nous pouvons citer les cellules de l'épiderme (Huo et al., 2010; Wang et al., 2010; Keller et al., 2014), les cellules de crêtes neurales issues d'iPS (Otsu et al., 2012, 2014; Acuña-Mendoza et al., 2013) ou encore les cellules de la moelle osseuse (Ohazama et al., 2004; Hu et al., 2006b; Li et al., 2007) et montré qu'elles étaient capables de participer à la formation de tissus dentaires. Dans notre modèle, nous avons remarqué que malgré un mélange homogène avec les cellules mésenchymateuses dentaires, les CDMO GFP<sup>+</sup> se concentrent en périphérie des dents formées pendant l'étape de culture *in vitro* et conservent la même localisation durant l'étape d'implantation. Ce résultat suggère que, dans nos conditions expérimentales, ces cellules ne participent pas activement au développement de la dent (Kökten et al., in press). Par ailleurs, nous avons remarqué que les dents obtenues étaient de petites tailles, probablement du fait du nombre restreint de cellules mésenchymateuses dentaires en interaction avec le tissu épithélial (Hu et al., 2006a). Ce résultat semble confirmer la non participation des CDMO au



développement de la dent. Pour tenter d'augmenter la taille des dents, il serait intéressant de tester une augmentation du nombre de cellules du compartiment mésenchymateux (cellules mésenchymateuses dentaires et CDMO dans les mêmes proportions). Cependant, l'élément limitant deviendrait alors la surface de contact entre ces cellules et l'épithélium dentaire. Une autre alternative consisterait à tenter d'induire les CDMO vers un phénotype odontogène en utilisant un épithélium dentaire à un stade où il est encore instructif (avant le JE12,5) (Mina et Kollar, 1987).

En effet, Ohazama *et coll.*, (2004) ont montré que les CDMO issues de cultures primaires et réassociées à des épithéliums oraux du JE10 peuvent se différencier en odontoblastes et induire en retour une différenciation améloblastique pour former une dent dans 10% des cas. D'autre part, une étude menée par notre équipe avait montré que la fraction c-kit<sup>+</sup> de CDMO non cultivées et mélangées à des cellules épithéliales dentaires du JE14 avant d'être réassociées à un tissu mésenchymateux dentaire du même stade étaient capables de participer activement au développement de la dent. En effet, selon leur position dans la réassociation, elles peuvent se différencier en améloblastes ou en odontoblastes (Hu et al., 2006b). De même, il a été montré qu'après une injection de CDMO GFP<sup>+</sup> dans le flux sanguin et suite à une lésion au niveau de l'os alvéolaire de la mâchoire, la fraction CD90<sup>+</sup> de ces cellules est capable de participer activement à la régénération dentaire (Zhou et al., 2011). Dans nos expériences, nous avons utilisé des CDMO au passage 2 afin d'avoir une population cellulaire homogène (Ball et al., 2007). Les passages cellulaires sont probablement à l'origine de pertes de potentialités chez ces cellules. En effet, des études antérieures menées au laboratoire avaient montré pour les cellules dentaires embryonnaires, que la culture *in vitro* induisait des changements phénotypiques et la perte de leur capacité à s'engager dans un développement dentaire (Keller et al., 2011; Keller et al., 2012). Des résultats similaires ont également été décrits pour les CDMO : leur culture *in vitro* induit la perte de potentialités cellulaires et des altérations dans l'expression des marqueurs de surfaces (Baxter et al., 2004; Potapova et al., 2008). Ainsi, pour favoriser la différenciation de CDMO en cellules dentaires, il conviendra de tester ces cellules non cultivées. Une autre alternative consisterait à isoler une sous-population de CDMO pour rechercher des cellules plus compétentes (Hu et al., 2006b).

Pour permettre l'odontogénèse, les cellules sélectionnées doivent conserver leur potentiel odontogène ou leurs compétences à répondre à une signalisation odontogène durant leur expansion *in vitro*. Elles doivent également être capables de former une jonction épithélio-mésenchymateuse (JEM) stable et d'induire la formation d'un nœud de l'émail

primaire (NEP) indispensable au bon déroulement de l'histomorphogenèse dentaire (Keller et al., 2013). En effet, le développement de la dent repose sur des interactions réciproques et continues entre le tissu épithélial et le tissu mésenchymateux (Ruch et al., 1983; Thesleff and Sharpe, 1997).

Néanmoins, aucune étude n'a encore permis de démontrer la capacité des cellules souches non dentaires à former une dent dans son intégralité. Il serait donc nécessaire pour la suite :

- De tester dans un premier temps, le comportement d'un épithélium dentaire prélevé avant le JE12,5 à induire la formation d'une JEM dentaire lorsqu'il est réassocié à des cellules souches. Le faible pourcentage de résultats positifs obtenu par Ohazama *et coll.*, (2004) reflète les multiples difficultés techniques que cela pose.
- De trouver des cellules mésenchymateuses capables, en plus des critères cités précédemment, de se différencier pour reconstituer l'hétérogénéité pulpaire (Keller et al., 2013; Otsu et al., 2014).
- Il sera sans doute nécessaire d'ajuster notre méthodologie établie pour l'innervation dentaire à ces nouvelles cellules candidates.
- Si l'innervation est possible, il serait alors intéressant de rechercher les mécanismes cellulaires impliqués.

---

## **PARTIE 6**

## **ANNEXES**

---

**Annexe 1 :**

**Nanofibers implant functionalized by neural growth factor as a strategy to innervate a bioengineered tooth.**

Eap S, Bécavin T, Keller L, Kökten T, Fioretti F, Weickert JL, Deveau E, Benkirane-Jessel N, Kuchler-Bopp S (2014). *Adv Healthc Mater.* 2014 Mar;3(3):386-91.

# Nanofibers Implant Functionalized by Neural Growth Factor as a Strategy to Innervate a Bioengineered Tooth

Sandy Eap, Thibault Bécavin, Laetitia Keller, Tunay Kökten, Florence Fioretti, Jean-Luc Weickert, Etienne Deveaux, Nadia Benkirane-Jessel,\* and Sabine Kuchler-Bopp

Current strategies for jaw reconstruction require multiple procedures, to repair the bone defect, to offer sufficient support, and to place the tooth implant. The entire procedure can be painful and time-consuming, and the desired functional repair can be achieved only when both steps are successful. The ability to engineer combined tooth and bone constructs, which would grow in a coordinated fashion with the surrounding tissues, could potentially improve the clinical outcomes and also reduce patient suffering. A unique nanofibrous and active implant for bone–tooth unit regeneration is demonstrated and also the innervation of this bioengineered tooth. A nanofibrous polycaprolactone membrane is functionalized with neural growth factor, along with dental germ, and tooth innervation follows. Such innervation allows complete functionality and tissue homeostasis of the tooth, such as dentinal sensitivity, odontoblast function, masticatory forces, and blood flow.

The materials focus is limited to three-dimensional applications and emerging classes of polymeric biomimetic materials, such as nanofibrillar and supramolecular materials formed by self-assembly processes. The guidance provided by biomaterials may facilitate restoration of structure and function of damaged or dysfunctional tissues. Such materials should provide provisional 3D support to interact with cells to control their function, guiding the spatially and temporally complex multicellular processes of tissue formation and regeneration.<sup>[1–6]</sup>

The ultimate goal of regenerative therapy is to develop fully functioning bioengineered organs that work in cooperation with surrounding tissues to replace damaged organs. Our understanding of

embryonic development and tissue engineering technology has influenced regenerative therapy. The strategy to develop a bioengineered tooth after the loss of deciduous and permanent teeth is to properly mimic the processes which occur during embryonic development through the reconstitution of a bioengineered tooth germ in vitro.<sup>[7,8]</sup> Tooth replacement regenerative therapy, which is also induced by epithelial and mesenchymal interactions during the development,<sup>[7]</sup> could be a model system to evaluate not only tooth development but also the revascularization and the re-innervation of this bioengineered tooth.

Recently, the fibrillar architecture of natural extracellular matrix (ECM) components has inspired several researchers to produce materials with similar structure.<sup>[9,10]</sup> Polymer processing technologies such as electrospinning<sup>[11]</sup> allow fiber formation down to the 10-nm scale. One difficulty in nanofiber technology has been in placing cells within a nanofibrillar structure with pore spaces much smaller than a cellular diameter; somehow the network must be formed in situ, around the cells, without cellular damage.

In recent years, considerable effort has been devoted to the design and controlled fabrication of structured matrices with functional properties.<sup>[12–23]</sup> Therapeutics and biomolecules including peptides, proteins, and nucleic acids have been incorporated into multilayered films, which offer new opportunities for the preparation of functionalized bioactive coatings.<sup>[13–15]</sup> These nanoarchitectures can be designed to exhibit specific properties, including control of cell activation.<sup>[16–20]</sup> Degradable layered structures would be profitable for progressive delivery of associated active agents.<sup>[21,23–29]</sup>

## 1. Introduction

Tissue engineering is an interdisciplinary field in which a variety of processing methods have been utilized with synthetic and natural polymers to fabricate scaffolds for the regeneration of tissues and organs. The study of structure–function relationships in both normal and pathological tissues has been coupled with the development of biologically active substitutes or engineered materials.

S. Eap, T. Bécavin, Dr. L. Keller, T. Kökten, Dr. F. Fioretti, Dr. N. Benkirane-Jessel, Dr. S. Kuchler-Bopp  
Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), UMR 1109,  
Osteoarticular and Dental Regenerative  
Nanomedicine, Faculté de Médecine,  
67085 Strasbourg Cedex, France  
Université de Strasbourg  
Faculté de Chirurgie Dentaire  
1 place de l'Hôpital, 67000, Strasbourg, France  
E-mail: nadia.jessel@inserm.fr



J.-L. Weickert  
Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire  
Service de Microscopie Electronique  
1 rue 67404 Illkirch CEDEX, France  
T. Bécavin, Prof. E. Deveaux  
Université Lille Nord de France  
Faculté de Chirurgie Dentaire  
INSERM UMR 1008 "Controlled Drug Delivery Systems  
and Biomaterials", 59006, Lille, France

DOI: 10.1002/adhm.201300281



Different studies report the use of polyglycolic acid or collagen sponge for bone and tooth regeneration.<sup>[30–32]</sup> However, it has also been reported that collagen sponge scaffold is superior to the polyglycolic acid fiber mesh scaffold for tooth tissue engineering.<sup>[32]</sup> To mimic the collagen matrix, different groups reported the possibility to electrospin different kinds of polymers.<sup>[33]</sup> Different studies also reported cell electrospinning.<sup>[34]</sup> These authors demonstrated that living organisms can be directly electrospun successfully, as fine composite threads that encapsulate a biosuspension containing living cells, by using a coaxial needle configuration and a biocompatible polymer.<sup>[34,35]</sup>

Here we use an FDA-approved polymer poly( $\epsilon$ -caprolactone), PCL, as a matrix. Herein, we produce a PCL-nanofiber electrospun membrane with the possibility to incorporate active molecules in the nanofiber coating. Our strategy is based on an active PCL membrane. PCL is degraded by hydrolysis of its ester linkages under physiological conditions (such as in the human body) and has therefore received a great deal of attention for use as an implantable biomaterial.<sup>[29]</sup> In a previous study, we used an electrospun PCL membrane functionalized with bone morphogenetic protein-2 (BMP-2),<sup>[29]</sup> as substrate to induce bone regeneration. We have as well used this PCL membrane without functionalization for bone–tooth unit regeneration.<sup>[36]</sup> Herein we have chosen to functionalize our membrane with neural growth factor (NGF). It is reported that p75 neurotrophin receptor,<sup>[37]</sup> which is the receptor of NGF, is localized in dental pulp and expressed by the fibroblasts particularly near the odontoblastic layer. Thus, in this study, NGF has been chosen to induce the innervation of bioengineered tooth from dental germ. We have also used the same method as before to functionalize nanofibrous PCL membrane by NGF and followed the tooth innervation.

## 2. Results and Discussion

We first followed the regeneration of a tooth on our electrospun PCL membrane. For this aim, the first lower molars from embryonic day ED14 (tooth germ) were cultured, for 5 days and 10 days on semisolid medium as a control and on our implant membrane (Mb; Figure S1, Supporting Information). After 5 days of culture on our PCL membrane (Figure S1,B,C, Supporting Information), like on our control (Figure S1A, Supporting Information), the first lower molar reached a stage where epithelial histogenesis was achieved, showing distinct inner (IDE) and outer dental epithelium, stellate reticulum (SR) and stratum intermedium (SI). Cusps were also formed and secondary enamel knots (SEK) were present at their tips. Our results indicate clearly that we are able to regenerate teeth on the electrospun PCL membranes. This 3D nanofibrous membrane could be used as a support for tooth regeneration. After 10 days on our PCL membrane (Figure S1,E,F,G, Supporting Information), as well as on our control (Figure S1D, Supporting Information), elongated and polarized odontoblasts (Od) became functional with predentin/dentin secretion. At this stage, elongated but not functional ameloblasts (Am) are present (Figure S1, Supporting Information). Dental germ development occurs well on PCL membrane as on the usual semisolid medium.

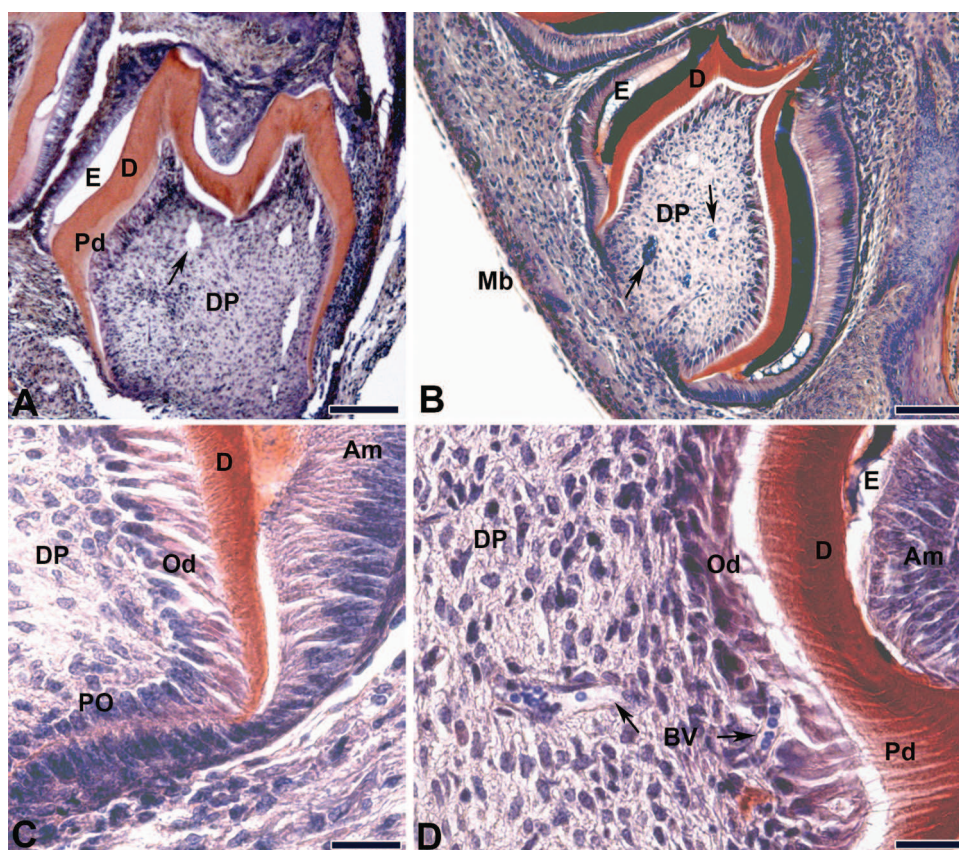
To get more information concerning in vivo tooth regeneration on our implant, we followed the dental germs cultured for 6 days on semisolid medium (Figure 1A), as a control, or on our electrospun PCL membranes (Figure 1B,C,D) after subcutaneous implantation, near the ear of mice for two weeks. Our results indicate clearly that after two weeks implantation of the dental germ cultured on the electrospun PCL membranes, correct development of the crown occurs, with functional odontoblasts and ameloblasts (Figure 1B). Secretion of predentin/dentin and enamel occurred at this stage of the development. Elongated and polarized odontoblasts also secreted predentin/dentin (Figure 1D). At this stage, blood vessels were found in direct contact with odontoblasts, the development of the root was started normally, and the gradients of odontoblast differentiation were maintained in the root portion (Figure 1C). We report here the first demonstration that we are able to support not only in vitro but also in vivo tooth regeneration on the electrospun PCL membrane as a 3D support ready to use as an implant for tooth regeneration. Our results indicate clearly that we have good development of the tooth germ after implantation on a PCL membrane.

For more characterization of the induced tooth on this nanofiber membrane, the blood vessels in the dental pulp and in the peridental tissue were stained with an anti-CD31 antibody (Figure 2A), while the odontoblasts and their extensions were stained with an anti-nestin antibody (Figures 2B) and the ameloblasts and enamel with an anti-amelogenin antibody (Figure 2C).

We are evidently able to regenerate the tooth by using the dental germ and the electrospun PCL membrane as a substrate. The tissues that developed as toothlike structures exhibited normal epithelial histogenesis and allowed the functional differentiation of odontoblasts and ameloblasts. After implantation, we detected not only a normal secretion of dentin and enamel formation but also root development. Based on these results, we report here the first demonstration of a unique hybrid material for tooth regeneration in vitro and in vivo. In Figure 2, our results indicate no innervation after implantation of the ED14 germs on unfunctionalized PCL membrane. We have also shown the same results by using functionalized membranes with bovine serum albumin (BSA) or NGF. These results could be explained by the fact that at this stage (ED14) of development, no axons could be detected.

We are also able to induce in vivo bone–tooth unit regeneration and revascularization (Figure S2, Supporting Information).<sup>[36]</sup> However, no innervation of the regenerated tooth was detected with or without electrospun PCL membrane. To resolve this problem, a new strategy was engaged to obtain a fully physiological development of the tooth germ including innervation of the dental pulp.

Recently we have shown that we are able to electrospin PCL membranes. We are able to functionalize these electrospun PCL membranes by incorporation of BMP-2 as therapeutic agent.<sup>[29]</sup> To induce innervation of the bioengineered tooth, we used the same strategy as before based on active nanoreservoirs of BMP-2<sup>[29]</sup> to incorporate NGF as an active molecule. To show the effectiveness of our functionalization, we analyzed the electrospun membrane of PCL coated with nanoreservoirs by using scanning electron microscopy (SEM) and have shown that we were

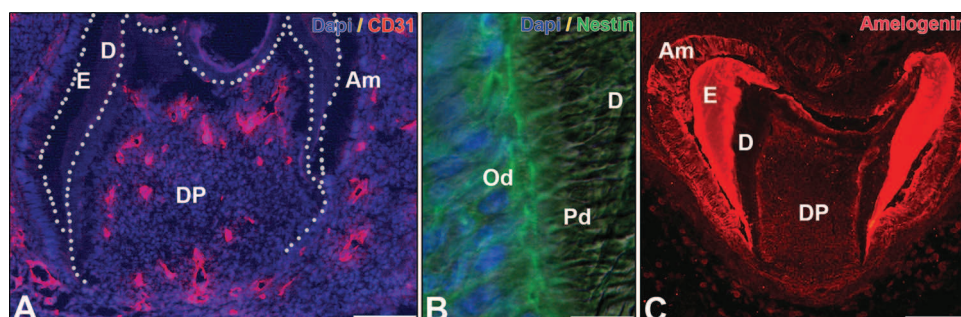


**Figure 1.** In vivo implantation for 2 weeks of ED14 first lower molars cultured 6 days on A) semisolid medium as a control or B–D) on electrospun PCL membranes. The black arrows indicate the blood vessels. Am: ameloblasts, BV: blood vessel, D: dentin, DP: dental pulp, E: enamel, Od: odontoblasts, Pd: predentin, PO: preodontoblasts. Scale bars: A,B = 100  $\mu$ m; C,D = 25  $\mu$ m.

able to incorporate NGF (Figure S3B, Supporting Information). In comparison, without coating, the electrospun fibers presented a smooth morphology (Figure S3A, Supporting Information).

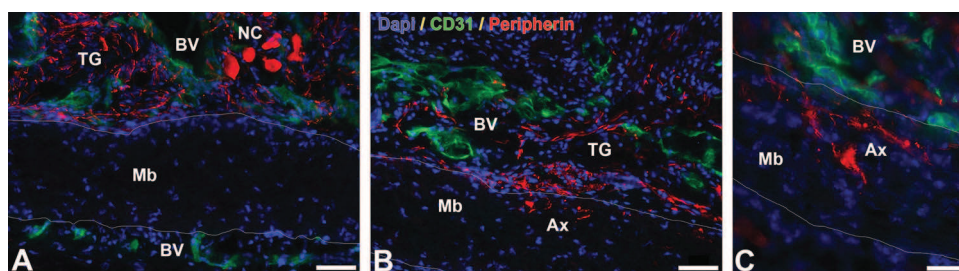
To induce innervation of our bioengineered tooth, we used the trigeminal ganglion (TG) to supply neurons that physiologically innervate the tooth germ.<sup>[38,39]</sup> First, we showed that TG could be cultivated onto PCL membranes with or without NGF. BSA was incorporated into the nanoreservoirs in place of NGF as a control. After 2 weeks of subcutaneous implantation

in mouse, no development of the axons (Ax), detected by an anti-peripherin antibody, of the TG into the control membrane without NGF (Figure 3A) was noted. In comparison, functionalization with NGF clearly improved the growth of axons from the TG into the active PCL membrane (Figure 3B,C). As a negative control we functionalized our membrane with BSA. After implantation in the presence of the dental germ (ED14) and the trigeminal ganglion (TG), no innervation was detected without NGF. However, when the membrane is functionalized



**Figure 2.** Immunofluorescence detection after 2 weeks implantation of ED14 first lowers molars growing on the PCL membrane. A) Vascularization was detected with specific CD31 (red), B) odontoblasts were stained with nestin (green), and C) ameloblasts and enamel were detected by amelogenin (red). Nuclei were stained with 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI; A, B, blue). Scale bars: A,C = 100  $\mu$ m; B = 25  $\mu$ m.





**Figure 3.** In vivo implantation for 2 weeks of trigeminal ganglia (TG) on electrospun PCL membranes functionalized with A) BSA as negative control, B)  $(\text{DGL-G4/NGF})_3$ , and C)  $(\text{DGL-G4/NGF})_6$ . Axons were stained with peripherin (red) blood vessels with CD31 (green) and nuclei with DAPI (blue). Axons (Ax) clearly penetrate into the PCL membrane functionalized with NGF (B,C) in contrast with the control membrane (A). NC: neural cells. Scale bars: A,B = 5  $\mu\text{m}$ ; C = 25  $\mu\text{m}$ .

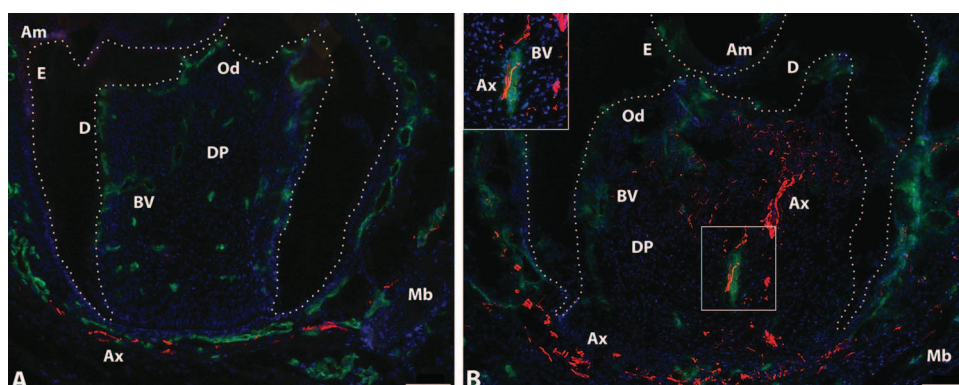
with NGF the innervation occurs. We have also shown that increasing the size of the nanoreservoirs (number of bilayers 3-6)  $(\text{DGL-G4/NGF})_3$  (Figure 3B) or  $(\text{DGL-G4/NGF})_6$  (Figure 3C) leads to an increased number of axons growing into the active membrane, which thereby shows the activity of our nanoreservoirs functionalized with NGF. Our results obviously indicate the capability of our nanoreservoirs with NGF to draw axons from the TG into the active PCL membrane.

To induce innervation of the bioengineered tooth, first lower molar tooth germs at ED14, associated with TG, were cultured overnight onto the control membrane without or with  $(\text{DGL-G4/NGF})_3$  nanoreservoirs and then implanted subcutaneously for 2 weeks. A satisfying vascularization but no innervation of the dental pulp (DP) was observed on our control membrane (Figure 4A). Without any active nanoreservoirs, underneath axons grew without innervation of the dental pulp (Figure 4A). Interestingly, with the active membrane  $(\text{DGL-G4/NGF})_3$ , axon growth and full innervation of the tooth germ occurred (Figure 4B), indeed, axons even reached the odontoblastic layer. Furthermore, axons and blood vessels grew all together which leads to a physiologically vascularized and innervated tooth germ (Figure 4B). These results show clearly that a lot of axons penetrate into the dental pulp when TG are coimplanted with ED14 germs on a PCL membrane functionalized with NGF.

### 3. Conclusion

We have shown that it is possible to use an electrospun PCL membrane as a tooth germ substrate to regenerate teeth in vitro and in vivo. We have also shown that we are able to functionalize this electrospun membrane with active nanoreservoirs of NGF to promote the development of the TG that physiologically innervate the tooth germ, to bring neurons and its axons into the active membrane. After implantation of a tooth germ with a TG on our functionalized NGF membrane, we are able to induce a fully vascularized and innervated tooth.

With this strategy it should be possible to fabricate a combination cell-therapy implant capable of the regeneration of a vascularized and innervated tooth for tooth replacement regenerative therapy. We intend to develop this technology further to achieve the deposition of more active molecules such as BMP-2 to induce bone regeneration and finally bone-tooth unit regeneration. It will be also attractive to use cell electrospinning technology to encapsulate our dental germ and follow the tooth regeneration.<sup>[34,35]</sup> We believe that our results make a significant contribution to the area of regenerative medicine. The concepts detailed here are applicable to a broad class of tissues and may aid in the design of sophisticated implants.



**Figure 4.** In vivo implantation for two weeks of TG and ED14 first lower molars on electrospun PCL membranes with A)  $(\text{DGL-G4/BSA})_3$  and B) active nanoreservoirs  $(\text{DGL-G4/NGF})_3$ . Axons were stained with peripherin (red) blood vessels with CD31 (green) and nuclei with DAPI (blue). The insert in B shows the association between blood vessel and axon. Scale bars: 50  $\mu\text{m}$ .

## 4. Experimental Section

**Chemicals:** Poly( $\epsilon$ -caprolactone) (PCL), analytical grade, was purchased from Sigma Aldrich. PCL was dissolved in a mixture of dichloromethane/dimethylformamide (DCM/DMF 50/50 vol/vol) at 25% wt/vol and was stirred overnight before use. Rat-tail type I collagen was purchased from Institut de Biotechnologies Jacques Boy. Dendri Graft poly-L-lysine of the fifth generation (DGL-G<sup>4</sup>) was obtained from Colcom (Montpellier, France). Murine NGF was obtained from Sigma (USA). 2-(*N*-morpholino)ethanesulfonic acid (MES) buffer and sodium chloride were obtained from Aldrich (St Louis, USA).

**Electrospinning:** A standard electrospinning set-up apparatus EC-DIG purchased from IME Technologies (Eindhoven, Netherlands) was used to fabricate the PCL nanofibrous membranes. The PCL solution was poured into a 5 mL syringe and ejected through a 21G needle of 0.8 mm diameter at a flow rate of 1.2 mL h<sup>-1</sup> using a programmable pump (ProSense). The experiments were performed with a high voltage of +23 kV set on the needle. The associated collector connected to the ground at a distance from the needle of 16 cm was used to collect the electrospun PCL scaffold. After 20 min of electrospinning, the scaffold was detached from the collector. The obtained electrospun nanofiber PCL 50- $\mu$ m thick scaffolds contain nanofibers with an average diameter of 517  $\pm$  41 nm. The fibers were dried overnight at 45 °C, and cut into samples for a 24-well plate. After sterilization under UV for 30 min, the samples were incubated overnight in MES buffer before the construction of the nanoreservoirs. Fiber diameter measurement indicates that 68% of the fibers present a diameter under 500 nm. However a minority of the fibers (10%) have a diameter of over 1  $\mu$ m, which creates a slight bimodal distribution of the fiber diameter.

**Buildup of the Nanoreservoirs:** The DGL-G<sup>4</sup> solution was diluted to 50  $\mu$ g mL<sup>-1</sup> in 40 mM MES and 150 mM NaCl buffer, pH 5.5. The NGF solution was diluted to 600 ng mL<sup>-1</sup> in BSA at 1%. All wash baths were 40 mM MES and 150 mM NaCl solution buffer at pH 5.5. PCL scaffolds were functionalized by using the layer-by-layer method. The nanoreservoirs were fabricated according to the following protocol: The scaffolds were incubated in DGL-G<sup>4</sup> solution for 15 min, washed with the buffer solution for 15 min, and then incubated in NGF solution for 15 min and finally washed for 15 min, to construct a bilayer (DGL-G<sup>4</sup>/NGF) on the fiber surface. Repeating this protocol three or six times allowed the construction of (DGL-G<sup>4</sup>/NGF)<sub>3</sub> or (DGL-G<sup>4</sup>/NGF)<sub>6</sub> multilayered nanoreservoirs. The scaffolds were rinsed three times for 15 min with phosphate-buffered saline (PBS) and placed overnight at 4 °C in Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM/F12: Invitrogen, Villebon sur Yvette, France). The plates containing the scaffolds were prewarmed at 37 °C before cultivating the different tissues.

**Molar ED14 culture:** The first lower molars were dissected from ICR mouse (Charles River Laboratories, l'Arbresle, France) embryos at ED14. All procedures were in compliance with the recommendations of the European Economic Community (86/609/CEE) on use and care of laboratory animals. Molars were dissected and cultured for 6 d as previously described<sup>[8,40]</sup> on semisolid medium for control.

**Implant Preparation and In Vivo Implantation:** After six days culture on electrospun PCL membrane (with BSA or NGF), ED14 germs (ED14 M1) were implanted between skin and muscles behind the ears in mice (eight weeks old ICR) for two weeks (2w). For the innervation experiment, molars were cultured for six days (6d) on semisolid medium, then associated with trigeminal ganglion (TG) dissected from postnatal day 3 mice (1/4 TG for one molar) on PCL membrane (functionalized by BSA or NGF) and incubated overnight before subcutaneous implantation for two weeks (Table 1).

**Histological Preparation:** Samples were fixed in Bouin-Hollande medium, embedded in paraffin, and 5  $\mu$ m serial sections were stained with Mallory solution. Implanted samples were demineralized in 4.3% ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) solution for one week before embedding in paraffin.

**Immunofluorescence Staining:** Implants were embedded in Tissue-Tek and frozen at -20 °C. Sections (10  $\mu$ m) were stained with polyclonal rat anti-CD31 (1/100) (BD Pharmingen, Evry, France) for the detection

**Table 1.** Total number of implanted samples in each condition. Experiments were carried out in triplicate.

|                                           | ED14 M1 + 6d + 2w<br>implantation | TG + 2w<br>implantation | ED14 M1 + 6d + TG<br>+ 2w implantation |
|-------------------------------------------|-----------------------------------|-------------------------|----------------------------------------|
| PCL membrane function-<br>alized with BSA | 10                                | 3                       | 15                                     |
| PCL membrane function-<br>alized with NGF | 16                                | 8                       | 27                                     |

of vascular endothelial cells, polyclonal goat anti-nestin (1/200; Santa Cruz, Tebu-bio, Le Perray-en-Yvelines, France) for detection of odontoblasts and their extensions, polyclonal rabbit anti-amelogenin (1/200; Santa Cruz, Tebu-bio) for detection of ameloblasts and enamel, and polyclonal rabbit anti-peripherin (1/500; Abcam, Cambridge, UK) for axon detection. After washing with PBS, sections were incubated with secondary anti-rat or anti-rabbit antibodies conjugated to Alexa 594 (1/500) and anti-goat or anti-rat antibodies conjugated to Alexa 488 (1/200) (Molecular Probes, Invitrogen). Nuclei were stained with DAPI (Molecular Probes, Invitrogen).

## Supporting Information

Supporting Information is available from the Wiley Online Library or from the author.

## Acknowledgements

S.E., T.B., L.K., T.K., and F.F. contributed equally to this work. This work was supported by the project NanoOscar from the "Agence Nationale de la Recherche, ANR". N.J. is indebted to the "Faculté de Chirurgie Dentaire, Strasbourg" for financial support. N.J. is indebted to CHU de Nancy, Hôpital Central, "Chirurgie Orthopédique et Traumatologie" (Contrat d'interface INSERM vers l'hôpital). We are indebted to Hervé Gegout for his help and nice work on histology and Dr. Nadia Messadeq for her help with SEM analysis.

Received: July 11, 2013

Published online:

- [1] N. A. Peppas, R. Langer, *Science* **1994**, 263, 1715.
- [2] J. A. Hubbell, *Biotechnology* **1995**, 13, 565.
- [3] R. Langer, D. A. Tirrell, *Nature* **2004**, 428, 487.
- [4] C. Yang, P. J. Hillas, J. A. Baez, M. Nokelainen, J. Balan, J. Tang, R. Spiro, J. W. Polarek, *BioDrugs* **2004**, 18, 103.
- [5] L. G. Griffith, G. Naughton, *Science* **2002**, 295, 1009.
- [6] E. L. Chaikof, H. Matthew, J. Kohn, A. G. Mikos, G. D. Prestwich, C. M. Yip, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **2002**, 961, 96.
- [7] A. Nait Lechguer, M. L. Couble, N. Labert, S. Kuchler-Bopp, L. Keller, H. Magloire, F. Bleicher, H. Lesot, *J. Dent. Res.* **2011**, 90, 583.
- [8] A. Nait Lechguer, S. Kuchler-Bopp, B. Hu, Y. Haikel, H. Lesot, *J. Dent. Res.* **2008**, 87, 1138.
- [9] F. Oberpenning, J. Meng, J. J. Yoo, A. Atala, *Nat. Biotechnol.* **1999**, 17, 149.
- [10] K. I. Park, Y. D. Teng, E. Y. Snyder, *Nat. Biotechnol.* **2002**, 20, 1111.
- [11] .El-R. Kenawy, J. M. Layman, J. R. Watkins, G. L. Bowlin, J. A. Matthews, D. G. Simpson, G. E. Wnek, *Biomaterials* **2003**, 24, 907.
- [12] S. Zhang, *Nat. Biotechnol.* **2003**, 21, 1171.
- [13] D. M. Lynn, *Soft Matter* **2006**, 2, 269.

- [14] G. Decher, *Science* **1997**, 277, 1232.
- [15] N. Jessel, F. Atalar, P. Lavalle, J. Mutterer, G. Decher, P. Schaaf, J. C. Voegel, J. Ogier, *Adv. Mater.* **2003**, 15, 692.
- [16] N. Benkirane-Jessel, P. Lavalle, F. Meyer, F. Audouin, B. Frisch, P. Schaaf, J. Ogier, G. Decher, J. C. Voegel, *Adv. Mater.* **2004**, 16, 1507.
- [17] N. Benkirane-Jessel, P. Schwinte, P. Falvey, R. Darcy, Y. Haikel, P. Schaaf, J. C. Voegel, J. Ogier, *Adv. Funct. Mater.* **2004**, 14, 174.
- [18] N. Jessel, M. Oulad-Abdelghani, F. Meyer, P. Lavalle, Y. Haikel, P. Schaaf, J. C. Voegel, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2006**, 103, 8618.
- [19] B. S. Kim, S. W. Park, P. T. Hammond, *ACS Nano* **2008**, 2, 386.
- [20] N. Benkirane-Jessel, P. Lavalle, E. Hubsch, V. Holl, B. Senger, Y. Haikel, J. C. Voegel, J. Ogier, P. Schaaf, *Adv. Funct. Mater.* **2005**, 15, 648.
- [21] A. Dierich, E. Le Guen, N. Messaddeq, J.-F. Stoltz, P. Netter, P. Schaaf, J.-C. Voegel, N. Benkirane-Jessel, *Adv. Mater.* **2007**, 19, 693.
- [22] S. Facca, C. Cortez, C. Mendoza-Palomares, N. Messaddeq, A. Dierich, A. P. R. Johnston, D. Mainard, J. C. Voegel, F. Caruso, N. Benkirane-Jessel, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2010**, 107, 3406.
- [23] K. C. Krogman, J. L. Lowery, N. S. Zacharia, G. C. Rutledge, P. T. Hammond, *Nat. Mater.* **2009**, 8, 512.
- [24] F. Fioretti, C. Mendoza-Palomares, M. Helms, D. Al Alam, L. Richert, Y. Arntz, S. Rinckenbach, F. Garnier, Y. Haikel, S. C. Gangloff, N. Benkirane-Jessel, *ACS Nano* **2010**, 4, 3277.
- [25] A. Nadiri, S. Kuchler-Bopp, H. Mjahed, B. Hu, Y. Haikel, P. Schaaf, J. C. Voegel, N. Benkirane-Jessel, *Small* **2007**, 3, 1577.
- [26] C. P. Barnes, S. A. Sell, E. D. Boland, D. G. Simpson, G. L. Bowlin, *Adv. Drug Delivery Rev.* **2007**, 59, 1413.
- [27] H. S. Yoo, T. G. Kim, T. G. Park, *Adv. Drug Delivery Rev.* **2009**, 61, 1033.
- [28] P. Taddei, A. Tinti, M. Reggiani, C. Fagnano, *J. Mol. Struct.* **2005**, 744, 135.
- [29] C. Mendoza-Palomares, A. Ferrand, S. Facca, F. Fioretti, G. Ladam, S. Kuchler-Bopp, T. Regnier, D. Mainard, N. Benkirane-Jessel, *ACS Nano* **2012**, 6, 483.
- [30] C. S. Young, S. Terada, J. P. Vacanti, M. Honda, J. D. Bartlett, P. C. Yelick, *J. Dent. Res.* **2002**, 81, 695.
- [31] C. S. Young, H. Abukawa, R. Asrican, M. Ravens, M. J. Troulis, L. B. Kaban, J. P. Vacanti, P. C. Yelick, *Tissue Eng.* **2005**, 11, 1599.
- [32] Y. Sumita, M. J. Honda, T. Ohara, S. Tsuchiya, H. Sagara, H. Kagami, M. Ueda, *Biomaterials* **2006**, 27, 3238.
- [33] W. Liu, S. Thomopoulos, Y. Xia, *Adv. Healthcare Mater.* **2012**, 1, 10.
- [34] A. Townsend-Nicholson, S. N. Jayasinghe, *Biomacromolecules* **2006**, 7, 3364.
- [35] D. Poncelet, P. de Vos, N. Suter, S. N. Jayasinghe, *Adv. Healthcare Mater.* **2012**, 1, 26.
- [36] S. Kuchler-Bopp, T. Bécavin, T. Kökten, F. Fioretti, E. Deveau, N. Benkirane-Jessel, L. Keller, *Open J. Regen. Med.* **2013**, unpublished.
- [37] S. Sarram, K. F. Lee, M. R. Byers, *J. Comp. Neurol.* **1997**, 385, 297.
- [38] C. Lillesaar, C. Eriksson, C. S. Johansson, K. Fried, C. Hildebrand, *J. Neurocytol.* **1999**, 28, 663.
- [39] C. Lillesaar, K. Fried, *Neuroscience* **2004**, 125, 149.
- [40] B. Hu, A. Nadiri, S. Bopp-Kuchler, F. Perrin-Schmitt, H. Lesot, *J. Dent. Res.* **2005**, 84, 521.



**Annexe 2 :**

**Nanostructured hybrid materials for bone-tooth unit regeneration.**

Kuchler-Bopp S, Bécavin T, Kökten T, Fioretti F, Deveau E, Benkirane-Jessel N, Keller L (2014). *Open Journal of Regenerative Medicine*, **2**, 47-52.

# Nanostructured hybrid materials for bone-tooth unit regeneration

Sabine Kuchler-Bopp<sup>1,2</sup>, Thibault Bécavin<sup>1,2,3</sup>, Tunay Kökten<sup>1,2</sup>, Florence Fioretti<sup>1,2</sup>, Etienne Deveaux<sup>3</sup>, Nadia Benkirane-Jessel<sup>1,2\*</sup>, Laetitia Keller<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), UMR 1109, Osteoarticular and Dental Regenerative Nanomedicine, Faculté de Médecine, Strasbourg, France; \*Corresponding Authors: [nadia.jessel@inserm.fr](mailto:nadia.jessel@inserm.fr), [laetitia.keller@inserm.fr](mailto:laetitia.keller@inserm.fr)

<sup>2</sup>Université de Strasbourg, Faculté de Chirurgie Dentaire, 1 Place de l'Hôpital, Strasbourg, France

<sup>3</sup>Université Lille Nord de France, Faculté de Chirurgie Dentaire, Lille, France

Received 19 April 2013; revised 22 May 2013; accepted 16 June 2013

Copyright © 2013 Sabine Kuchler-Bopp *et al.* This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

## ABSTRACT

As a part of regenerative medicine, biomaterials are largely used in this field of nanotechnology and tissue engineering research. We have recently developed a new scaffold using electrospun nanofibers of Poly ( $\epsilon$ -caprolactone), PCL which is able to mimic the collagen extracellular matrix of cells. The aim of this study was to engineer a biological and implantable structure leading the regeneration of the tooth-bone unit. For this aim, we have cultured mouse osteoblasts embedded in a collagen gel on the nanofibrous membrane and coupled this structure with an embryonic dental germ before implantation. To follow bone and tooth regeneration, we have performed RT-PCR, histology and immunofluorescence analysis. We showed here that this leaving implantable structure represents an accurate strategy for bone-tooth unit regeneration. We report here the first demonstration of bone-tooth unit regeneration by using a strategy based on a synthetic nanostructured membrane. This electrospun membrane is manufactured by using an FDA approved polymer, PCL and functionalized with osteoblasts before incorporation of the tooth germs at ED14 (the first lower molars) to generate bone-tooth unit *in vivo* after implantation in mice. Our technology represents an excellent platform on which other sophisticated products could be based.

**Keywords:** Bone; Nanostructured Material; Osteoblast; Tissue Engineering; Tooth

## 1. INTRODUCTION

Biomaterials play central roles in modern strategies in regenerative medicine and tissue engineering as designable biophysical and biochemical environment that direct cellular behavior and function. The fibrillar collagens are the most abundant natural polymers in the body and are found throughout the interstitial spaces with an essential function to impart structural integrity and strength to tissues. In the native tissues, the structural extracellular matrix (ECM) proteins range in diameter from 50 to 500 nm. In order to create scaffolds or ECM analogues, which are truly biomimicking at this scale, one must employ nanotechnology. Recent advances in nanotechnology have led to a variety of approaches for the development of engineered ECM analogues. To date, three processing techniques (self-assembly, phase separation, and electrospinning) have evolved to allow the fabrication of nanofibrous scaffolds. With these advances, the long-awaited and much anticipated construction of a truly “biomimicking” or “ideal” tissue engineered environment, or scaffold, for a variety of tissues is now highly feasible.

The intricate fibrillar architecture of natural ECM components has inspired several researchers to produce materials with similar structure. Upon fibers that are tens of microns in diameter, cells seem to respond as though to a 2-D substrate, acquiring an unnatural flat shape, leading to a nonphysiological, asymmetrical occupation of adhesion receptors; notwithstanding, such matrices have already shown remarkable success in tissue engineering applications, such as in the reconstruction of a dog urinary bladder [1] or as scaffolds for neural stem cells to facilitate regeneration after brain injury in a mouse stroke model [2]. Polymer processing technologies such as electrospinning [3] allow fiber formation

down to the 10 nm scale. One difficulty in nanofiber technology is placing cells within a nanofibrillar structure with pore spaces much smaller than a cellular diameter; somehow the network must be formed *in situ*, around the cells, without cellular damage.

Tooth organ engineering is an area of regenerative medicine. One methodology of this field of research is based on biomimetic. It tries to replace tooth organ by mimic epithelial-mesenchymal interaction occurring during tooth organ development [4]. Today, to build an intact and biological tooth-bone unit and regenerate a functional anchoring system (root, periodontal, ligament, alveolar bone) remains a major challenge in tooth organ engineering. Indeed, a correct anchoring system is needed for the complete tooth functionality, for avoiding tooth ankylosis and to prevent bone damage after tooth loss. It is expected that bioengineering technology will be developed for the reconstruction of fully functional organs *in vitro* through the precise arrangement of several different cell species.

Our strategy is based on an active and cellularized hydrogel and nanofibers as a matrix. In this study, we have used electrospun nanofibers of Poly ( $\epsilon$ -caprolactone) (PCL). PCL is degraded by hydrolysis of its ester linkages under physiological conditions (such as in the human body) and has therefore received a great deal of attention for use as an implantable biomaterial. In particular it is especially interesting for the preparation of long-term implantable devices, owing to its degradation, which is even slower than that of polylactide. PCL is a Food and Drug Administration (FDA) approved material that is used in the human body as (for example) a drug delivery device, suture (sold under the brand name Monocryl or generically), or adhesion barrier. We report here the first demonstration that we are able to regenerate bone-tooth unit by using a FDA approved electrospun membrane coated by mixed osteoblasts/collagen.

## 2. MATERIALS AND METHODS

### 2.1. Chemicals and Electrospinning

PCL, analytical grade, was purchased from Sigma Aldrich. PCL was dissolved in a mixture of dichloromethane/dimethylformamide (DCM/DMF 50/50 v/v) at 15% wt/v and was stirred overnight before use. Rat-tail type I collagen was purchased from Institut de Biotechnologies Jacques Boy. A homemade standard electrospinning set-up was used to fabricate the PCL scaffolds. The PCL solution was poured into a 5 ml syringe and ejected through a needle with a diameter of 0.5 mm at a flow rate of 1.2 ml/h, thanks to a programmable pump (Harvard Apparatus). A high-voltage power supply (SPELLMAN, SL30P10) was used to set 15 kV at the needle. Aluminum foils ( $20 \times 20 \text{ cm}^2$ ), connected to the ground at a

distance from the needle of 17 cm, were used to collect the electrospun PCL scaffold.

### 2.2. SEM Observation

For morphological study, the PCL scaffolds were gold-coated (Edwards Sputter Coater) and observed with a Philips XL-30 ESEM scanning electron microscope in conventional mode (high vacuum) with a Thornley-Everhart secondary electron detector.

### 2.3. Cells Culture

Mice primary osteoblasts were obtained from parietal bone, cut in small pieces, washed in PBS and treated for 40 min at 37°C with PBS containing collagenase (50  $\mu\text{g/ml}$ ) and fungizone (5  $\mu\text{g/ml}$ ). After washing in PBS, bone pieces were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (D-MEM<sup>®</sup>) containing 50 U/ml penicillin, 50  $\mu\text{g/ml}$  streptomycin, 5  $\mu\text{g/ml}$  fungizone, 1% sodium pyruvate, 0.1% ascorbic acid and 10% FBS (Life Technologies, Paisley, UK). The cultures were incubated at 37°C in a humidified atmosphere of 5% CO<sub>2</sub>. After 4 days the medium was changed. The generated osteoblasts were cultured in 75 cm<sup>2</sup> flasks and medium was changed every 3 days.

### 2.4. Immunocytochemistry and Osteoblasts Mineralization Staining

Cells were cultured for 14 days on electrospun PCL membrane, fixed with paraformaldehyde (PFA) 4% during 1 h, permeabilized with 0.1% PBS-Triton X-100 for 1 h, saturated with BSA 0.1% and incubated for 20 min with Alexa Fluor 546-conjugated phalloidin (Molecular Probes) for F-actin labeling and 5 min with 200 nM DAPI (Sigma) for nuclear staining. After saturation, cells were also incubated with the primary antibodies: Osteocalcin, Osteonectin, Osteopontin and Collagen I. After rinsing with PBS, cells were incubated with secondary antibodies; anti-goat alexa fluor 488 for Osteocalcin and Osteonectin and anti-rabbit alexa fluor 488 for Collagen I and Osteopontin. For hematoxylin staining, cells were fixed with PFA and then stained with hematoxylin 10% (w/v) for 15 min, rinsed with water and observed. For red alizarin staining, cells were fixed with ethanol 70% and stained with red alizarin 1% (w/v), dried and observed.

### 2.5. RNA Isolation and RT-PCR Analysis

RT-PCR was performed on osteoblasts cultured for 7 and 14 days. Total RNA was isolated by affinity chromatography using the RNeasy<sup>®</sup> Minikit (Qiagen Inc., Hilden, Germany) and reverse-transcribed with oligo (dT) 12 and Superscript III (Invitrogen), according to the manufacturer protocols. In each experiment 1  $\mu\text{g}$  of total

RNA was used for RT-PCR amplification was carried out with the Go Taq Hot Start kit (Promega, France) according to the manufacturer's instructions, using the specific primers (**Table 1**). PCR conditions were as followed: initial denaturation of 3 min at 94°C followed by 35 cycles at 94°C for 1 min, annealing for 1 min at 58°C and elongation for 1 min at 72°C, with a final extension of 10 min at 72°C. PCR products were separated by electrophoresis on 1.5% agarose gels.

## 2.6. Molar ED14 Culture

The first lower molars were dissected from ICR mouse (Charles River Laboratories), embryos at Embryonic Day (ED) 14. All procedures were in compliance with the recommendations of the European Economic Community (86/609/CEE) on use and care of laboratory animals. Molars have been cultured for 5 days on the electrospun PCL membrane and on a semi-solid medium as previously described [5,6].

## 2.7. Implant Preparation and *in Vivo* Implantation

For the Collagen preparation, 3 ml of Rat Tail Type I Collagen (Institut de Biotechnologies Jacques Boy) were mixed with 5.5 ml of medium containing 10% FBS, 0.5 ml of a 0.1 M NaOH and 1 ml of osteoblasts suspension at  $2 \times 10^5$  cells/ml. 0.1 ml of osteoblasts suspension/ collagen preparation were deposited on the top of the electrospun PCL membrane. After adding the ED14 tooth germs, the construct was incubated at 37°C for 30 min before implantation. For *in vitro* analysis, the osteoblasts were cultured for 7 and 14 days on electrospun PCL membrane. For *in vivo* analysis, the samples were implanted between skin and muscles behind the ears in mice (8 weeks old ICR) for 2 weeks. For histology, samples were fixed in Bouin-Hollande, embedded in paraffin and 5 µm serial sections were stained with Mallory. Implanted samples were demineralized in 15% EDTA before embedding in paraffin. For immunofluorescence, implants were embedded in Tissue-Tek and frozen at -20°C. Sections (10 µm) were stained with anti-CD31 (BD Pharmingen) for the detection of vascular endothelial cells, and with Osteopontin for the detection of bone.

After washing with PBS, sections were incubated with secondary anti-rabbit antibodies conjugated to Alexa 594 and anti-rat antibodies conjugated to Alexa 488 (Molecular Probes, Invitrogen).

## 3. RESULTS AND DISCUSSION

### 3.1. *In Vitro* Bone Induction Analysis

For bone induction analysis, we have currently analyzed the biocompatibility of our electrospun PCL membrane after incubation of primary mice osteoblasts by SEM analysis (**Figure 1**). Moreover, our results indicated clearly that after 4 hours, the adhesion of cells growing on the surface of the membrane become comparable to the positive control including plastic support (data not shown).

We have also studied the behavior of mice osteoblasts growing on nanofibrous PCL membrane by histology (**Figures 2(A)-(C)**) and immunofluorescence (**Figures 2(D)-(H)**). After 14 days *in vitro*, these cells expressed some bone specific proteins: collagen I, Osteonectin, Osteocalcin and Osteopontin (**Figures 2(E)-(H)**). Furthermore we showed a nice mineralization by red alizarin in these cells after 14 days *in vitro* (**Figure 2 (C)**) and normal actin distribution (**Figure 2 (D)**). Gene expression of these molecules was also analyzed by RT-PCR (**Figure 3**) in 7 and 14 days cultured osteoblasts on the electrospun PCL membrane. Our results demonstrated clearly that the nanofibrous PCL membrane could be considered as a suitable scaffold for bone tissue engineering.

### 3.2. *In Vivo* Analysis of the Engineering Tooth-Bone Unit

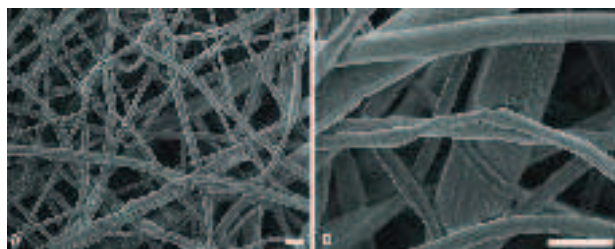
Recently, there has been an increasing interest and awareness of the importance of the sub-tooth bone for its role in the pathogenic processes. It's necessary to carefully consider this structure in the treatment of tooth damage, in the evaluation of the results over time and in the determination of the patient prognosis. In fact, the conditions of teeth and its supporting bone are tightly coupled and should be viewed as a connected bone-tooth unit.

For the *in vivo* tooth-bone unit regeneration, we ana-

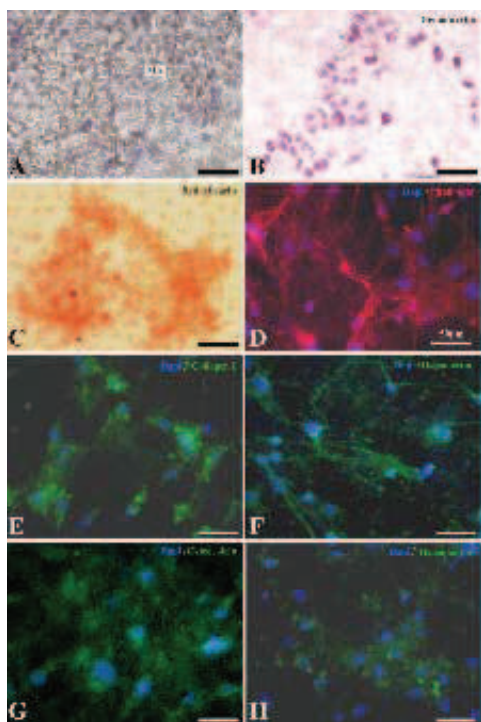
**Table 1.** Forward and reverse primers used for RT-PCR.

| Primers     | Forward                  | Reverse                   |
|-------------|--------------------------|---------------------------|
| GAPDH       | CCATGGAGAAGGCCGGGG       | CAAAGTTGTCATGGATGACC      |
| Collagen I  | AATGGTGAGACGTGGAAACCCGAG | CGACTCCTACATCTTCTGAGTTTGG |
| Osteopontin | GACCATGAGATTGACAGTGATTG  | TGATGTTCCAGGCTGGCTTTG     |
| Osteocalcin | GACAAAGCCTTCATGTCCAAGC   | AAAGCCGAGCTGCCAGAGTTTG    |
| Osteonectin | TGAGAATGAGAAGCGCCTGGA    | AAGGGGGTAATGGGAGGGGTG     |

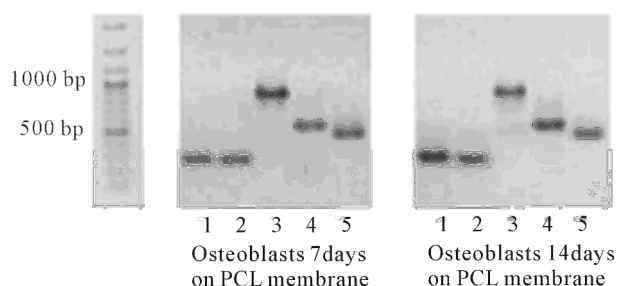




**Figure 1.** SEM observation of the nanofibrous PCL scaffolds (A, B). Bar = 1 μm.



**Figure 2.** Behaviour of mice osteoblasts growing on PCL nanofibrous membrane during 14 days. Hematoxylin staining for histology ((A), (B)), red alizarin staining for mineralization (C), alexa fluor 546-conjugated phalloidin for F-actin labeling (D) and immunofluorescence ((E)-(H)). Collagen I (E), Osteonectin (F), Osteocalcin (G), Osteopontin (H). Bar = 50 μm.



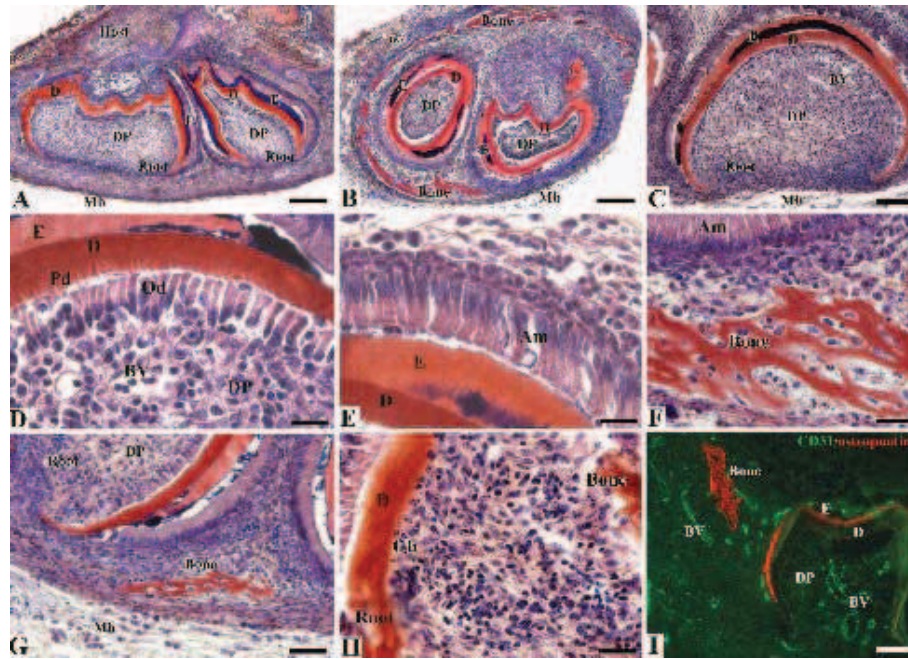
**Figure 3.** RT-PCR performed on mice osteoblasts cultured for 7 and 14 days on PCL membrane. The genes specifically observed were: Collagen I (1), Osteopontin (2), Osteocalcin (3), Osteonectin (4) and GADPH (5) for a control.

lyzed the subcutaneous implantation of the ED14 first lower molars cultured during 5 days on the nanofibrous PCL membrane (**Figure 4 (A)**). We observed a correct development of the crown, including functional odontoblasts and ameloblasts secreting dentin and enamel respectively. Furthermore, the gradients of odontoblast differentiation were maintained in the root portion.

We then test the possibility to regenerate bone-tooth unit by using a hybrid nanostructured and living material. After *in vivo* implantation of the tooth germs at ED14, cultured 5 days on the membrane without adding osteoblasts (**Figure 4 (A)**), no bone induction was detected. Interestingly, by adding mixed osteoblasts/collagen as a coating of the membrane (nanostructured living membrane) and after incubation of the tooth germs at ED14 and implantation, we have shown bone induction (**Figure 4 (B)**). In these conditions, the developed tooth exhibited correct epithelial histogenesis (**Figure 4 (B)**) and allowed the functional differentiation of odontoblasts (**Figure 4 (D)**) and ameloblasts (**Figures 4 (E)-(H)**). Induced bone was observed around the tooth (**Figures 4 (B)**, (**F)-(H)**) and especially near the root (**Figures 4 (G)** and (**H)**). Cementoblasts are in contact with the root dentin and begin to secrete cement (**Figure 4 (H)**). At this stage of development, orientation of the future fibers of the periodontal ligament can be yet observed (**Figure 4 (H)**). For more characterization of the induced bone-tooth unit growing on this nanofibers membrane, the blood vessels in the dental pulp and in the peripheral tissue were stained with an anti-CD31 antibody and the bone was visualized with anti-Osteopontin antibody (**Figure 4 (I)**). We then controlled that collagen had no effect on teeth development after implantation under skin (**Figure 4 (C)**). We attempt to implant ED14 molar with mixed murine osteoblasts/collagen without PCL membrane, with no results. Based on these results, we have reported here the first demonstration of a unique nanostructured material for bone-tooth unit regeneration *in vivo*. Thus, PCL nanofibrous membrane coated by mixed osteoblasts/collagen could represent a promising strategy of nanostructured living membrane for *in vivo* bone-tooth unit regeneration.

In the last years, more intentions are carrying on functionalization of different scaffold [3,7-18]. Multi layers film is one of the multiple technologies used to incorporate bioactives molecules [8-10]. Leading to a nanoarchitecture, these new generation of delivery molecules scaffold can provide the control of cell differentiation, inflammation [11,12] by the diffusion of growth factors, nucleic acids [13,15] in a controlled period of time and in a restricted localization. For example, the layer-by-layer technology can embed active molecules into the multilayered films. Recently, we have designed an *in vitro* culture system based on an active film functionalized by





**Figure 4.** Bone-tooth unit regeneration *in vivo*. *In vivo* implantation for 2 weeks of ED14 first lower molars cultured 5 days on electrospun PCL membrane (A), on mixed murine osteoblasts/collagen coated electrospun PCL membrane ((B), (D)-(I)) or on PCL membrane in the presence of collagen (C). The explants were stained with Mallory ((A)-(H)). The blood vessels in the dental pulp and in the periodontal tissue were stained with the anti-CD31 antibody (green) and the regenerated bone with the anti-Osteopontin antibody (red) (I). Am: ameloblasts, BV: blood vessel, Cb: cementoblasts, D: dentin, DP: dental pulp, E: enamel, Mb: membrane, Od: odontoblasts, Pd: predentin. Bars = 100  $\mu$ m ((A), (B)), 50  $\mu$ m ((C), (I)), 25  $\mu$ m (G) and 12.5  $\mu$ m ((D)-(F), (H)).

BMP-4 and/or Noggin. Our results demonstrated clearly the possibility to control *in situ* apoptosis during tooth development mediated by both BMP-4 and Noggin incorporated into our active films [19]. We have also shown that BMP-2 functionalized PCL membrane was able to increase bone tissue regeneration after implantation [20]. To increase the regeneration of this complex bone-tooth unit, it could be relevant to combine these two strategies (membrane functionalization and tooth regeneration). Particular attention has to be done to understand the interaction between the new bone and the tooth root. To regenerate of real functional bone-tooth unit, the periodontal ligament formation must be also achieved.

#### 4. CONCLUSION

With this strategy it should be possible to fabricate a combination cell-therapy implant capable of robust and durable tooth regeneration in large bone defects, when adding cells from patients become needed, to generate bone-tooth unit. We believe that our results make a significant contribution to the area of regenerative medicine and more precisely to bone and tooth related biomaterials. The concepts discovered here are applicable to

a broad class of tissues and may serve to design sophisticated implants.

#### 5. ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by the project NEOTISSAGE from the "Agence Nationale de la Recherche, ANR" and "Alsace contre le Cancer", N. J. thanks the Faculté de Chirurgie Dentaire de Strasbourg for financial support. N. J. is indebted to CHU de Nancy, Hôpital Central, "Chirurgie Orthopédique et Traumatologie" (Contrat d'interface INSERM vers l'hôpital). We are indebted to Hervé Gegout for his help and nice work on histology and Mathieu Erhardt for SEM.

#### REFERENCES

- [1] Oberpenning, F., Meng, J., Yoo, J.J. and Atala, A. (1999) De novo reconstitution of a functional mammalian urinary bladder by tissue engineering. *Nature Biotechnology*, **17**, 149-155. doi:10.1038/6146
- [2] Park, K.I., Teng, Y.D. and Snyder, E.Y. (2002) The injured brain interacts reciprocally with neural stem cells supported by scaffolds to reconstitute lost tissue. *Nature Biotechnology*, **20**, 1111-1117. doi:10.1038/nbt751
- [3] Kenawy, el R., Layman, J.M., Watkins, J.R., Bowlin, G.L., Matthews, J.A., Simpson, D.G. and Wnek, G.E. (2003). Electrospinning of poly(ethylene-co-vinyl alcohol) fibers.

- Biomaterials*, **24**, 907-913. doi:10.1155/2011/201834
- [4] Nait Lechguer, A., Couble, M.L., Labert, N., Kuchler-Bopp, S., Keller, L., Magloire, H., Bleicher, F. and Lesot, H. (2011) Cell differentiation and matrix organization in engineered teeth. *Journal of Dental Research*, **90**, 583-589. doi:10.1177/0022034510391796
- [5] Nait Lechguer, A., Kuchler-Bopp, S., Hu, B., Haikel, Y. and Lesot, H. (2008) Vascularization of engineered teeth. *Journal of Dental Research*, **87**, 1138-1143. doi:10.1177/154405910808701216
- [6] Hu, B., Nadiri, A., Bopp-Kuchler, S., Perrin-Schmitt, F. and Lesot, H. (2005) Dental epithelial histomorphogenesis *in vitro*. *Journal of Dental Research*, **84**, 521-525. doi:10.1177/154405910508400607
- [7] Zhang, S. (2003) Fabrication of novel biomaterials through molecular self-assembly. *Nature Biotechnology*, **21**, 1171-1178. doi:10.1038/nbt874
- [8] Lynn, D.M. (2006) Layers of opportunity: Nanostructured polymer assemblies for the delivery of macromolecular therapeutics. *Soft Matter*, **2**, 269-273. doi:10.1039/b517860f
- [9] Decher, G. (1997) Fuzzy nanoassemblies: Toward layered polymeric multicomposites. *Science*, **277**, 1232-1237. doi:10.1126/science.277.5330.1232
- [10] Jessel, N., Atalar, F., Lavalley, P., Mutterer, J., Decher, G., Schaaf, P., Voegel, J.-C. and Ogier, J. (2003) Bioactive coatings based on a polyelectrolyte multilayer architecture functionalized by embedded proteins. *Advanced Materials*, **15**, 692-695. doi:10.1002/adma.200304634
- [11] Benkirane-Jessel, N., Lavalley, P., Meyer, F., Audouin, F., Frisch, B., Schaaf, P., Ogier, J., Decher, G. and Voegel, J.-C. (2004) Control of monocyte morphology on and response to model surfaces for implants equipped with anti-inflammatory agents. *Advanced Materials*, **16**, 1507-1511. doi:10.1002/adma.200306613
- [12] Benkirane-Jessel, N., Schwinte, P., Falvey, P., Darcy, R., Haikel, Y., Schaaf, P., Voegel, J.-C. and Ogier, J. (2004) Build-up of polypeptide multilayer coatings with anti-inflammatory properties based on the embedding of piroxim-cyclodextrin complexes. *Advanced Functional Materials*, **14**, 174-182. doi:10.1002/adfm.200304413
- [13] Jessel, N., Oulad-Abdeighani, M., Meyer, F., Lavalley, P., Haikel, Y., Schaaf, P. and Voegel, J.-C. (2006) Multiple and time-scheduled *in situ* DNA delivery mediated by beta-cyclodextrin embedded in a polyelectrolyte multilayer. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **103**, 8618-8621. doi:10.1073/pnas.0508246103
- [14] Kim, B.S., Park, S.W. and Hammond, P.T. (2008) Hydrogen-bonding layer-by-layer-assembled biodegradable polymeric micelles as drug delivery vehicles from surfaces. *ACS Nano*, **2**, 386-392. doi:10.1021/nn700408z
- [15] Benkirane-Jessel, N., Lavalley, P., Hubsch, E., Holl, V., Senger, B., Haikel, Y., Voegel, J.C., Ogier, J. and Schaaf, P. (2005) Short-time timing of the biological activity of functionalized polyelectrolyte multilayers. *Advanced Functional Materials*, **4**, 648-654. doi:10.1002/adfm.200400129
- [16] Dierich, A., Le Guen, E., Messadeg, N., Stoltz, J.F., Netter, P., Schaaf, P., Voegel, J.-C. and Benkirane-Jessel, N. (2007) Bone formation mediated by synergy-acting growth factors embedded in a polyelectrolyte multilayer film. *Advanced Materials*, **19**, 693-697. doi:10.1002/adma.200601271
- [17] Facca, S., Cortez, C., Mendoza-Palomares, C., Messadeg, N., Dierich, A., Johnston, A.P., Mainard, D., Voegel, J.-C., Caruso, F. and Benkirane-Jessel, N. (2010) Active multilayered capsules for *in vivo* bone formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **107**, 3406-3411. doi:10.1073/pnas.0908531107
- [18] Krogman, K.C., Lowery, J.L., Zacharia, N.S., Rutledge, G.C. and Hammond, P.T. (2009) Spraying asymmetry into functional membranes layer-by-layer. *Nature Materials*, **8**, 512-518. doi:10.1038/nmat2430
- [19] Nadiri, A., Kuchler-Bopp, S., Mjahed, H., Hu, B., Haikel, Y., Schaaf, P., Voegel, J.-C. and Benkirane-Jessel, N. (2007) Cell apoptosis control using BMP4 and noggin embedded in a polyelectrolyte multilayer film. *Small*, **9**, 1577-1583. doi:10.1002/sml.200700115
- [20] Mendoza-Palomares, C., Ferrand, A., Facca, S., Fioretti, F., Ladam, G., Kuchler-Bopp, S., Regnier, T., Mainard, D. and Benkirane-Jessel, N. (2012) Smart hybrid materials equipped by nanoreservoirs of therapeutics. *ACS Nano*, **6**, 483-490. doi:10.1021/nn203817t

---

## **PARTIE 7**

# **REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES**

---

## **Références bibliographiques :**

Acuña-Mendoza S, Martin S, Ribes S, Keller L., Chaussain C, Lebrin L, et al. (2013). ES cells-derived ectomesenchymal cells for tooth engineering. *Bulletin du Groupement International pour la Recherche Scientifique en Stomatologie et Odontologie* 52:e7–e16.

Alhashimi N, Frithiof L, Brudvik P, Bakhiet M (1999). Chemokines Are Upregulated During Orthodontic Tooth Movement. *Journal of Interferon & Cytokine Research* 19:1047–1052.

Allard B, Couble M L, Magloire H, Bleicher F (2000). Characterization and gene expression of high conductance calcium-activated potassium channels displaying mechanosensitivity in human odontoblasts. *J. Biol. Chem.* 275:25556–25561.

Allard B, Magloire H, Couble ML, Maurin JC, Bleicher F (2006). Voltage-gated sodium channels confer excitability to human odontoblasts: possible role in tooth pain transmission. *J. Biol. Chem.* 281:29002–29010.

Arnerić SP, Honig MA, Milner TA, Greco S, Iadecola C, Reis DJ (1988). Neuronal and endothelial sites of acetylcholine synthesis and release associated with microvessels in rat cerebral cortex: ultrastructural and neurochemical studies. *Brain Res.* 454:11–30.

Arthur A, Rychkov G, Shi S, Koblar SA, Gronthos S (2008). Adult human dental pulp stem cells differentiate toward functionally active neurons under appropriate environmental cues. *Stem Cells* 26:1787–1795.

Arthur A, Shi S, Zannettino ACW, Fujii N, Gronthos S, Koblar Simon A (2009). Implanted adult human dental pulp stem cells induce endogenous axon guidance. *Stem Cells* 27:2229–2237.

Avery JK, Cox CF, Chiego DJ Jr (1980). Presence and location of adrenergic nerve endings in the dental pulps of mouse molars. *Anat. Rec.* 198:59–71.

Azérad J, Boucher Y, Pollin B (1992). [Demonstration of glutamate in primary sensory trigeminal neurons innervating dental pulp in rats]. *C. R. Acad. Sci. III, Sci. Vie* 314:469–475.

Ball LM, Bernardo ME, Roelofs H, Lankester A, Cometa A, Egeler RM, et al. (2007). Cotransplantation of ex vivo expanded mesenchymal stem cells accelerates lymphocyte recovery and may reduce the risk of graft failure in haploidentical hematopoietic stem-cell transplantation. *Blood* 110:2764–2767.

Basbaum AI, Gautron M, Jazat F, Mayes M, Guilbaud G (1991). The spectrum of fiber loss in a model of neuropathic pain in the rat: an electron microscopic study. *Pain* 47:359–367.

Baxter MA, Wynn RF, Jowitt SN, Wraith JE, Fairbairn LJ, Bellantuono I (2004). Study of telomere length reveals rapid aging of human marrow stromal cells following in vitro expansion. *Stem Cells* 22:675–682.

Bei M (2009). Molecular genetics of tooth development. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 19:504–510.

Belema-Bedada F, Uchida S, Martire A, Kostin S, Braun T (2008). Efficient homing of multipotent adult mesenchymal stem cells depends on FROUNT-mediated clustering of CCR2. *Cell Stem Cell* 2:566–575.

Bernardo ME, Fibbe WE (2013). Mesenchymal stromal cells: sensors and switchers of inflammation. *Cell Stem Cell* 13:392–402.

Bhatheja K, Field J (2006). Schwann cells: origins and role in axonal maintenance and regeneration. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 38:1995–1999.

Bishop MA (1987). An investigation of pulp capillaries and tight junctions between odontoblasts in cats. *Anat. Embryol.* 177:131–138.

Bletsa A, Fristad I, Berggreen E (2009). Sensory pulpal nerve fibres and trigeminal ganglion neurons express IL-1RI: a potential mechanism for development of inflammatory hyperalgesia. *Int Endod J* 42:978–986.

Bloch-Zupan A, Leveillard T, Gorry P, Fausser JL, Ruch JV (1998). Expression of p21(WAF1/CIP1) during mouse odontogenesis. *Eur. J. Oral Sci.* 106 Suppl 1:104–111.

Boskey AL (1991). The role of extracellular matrix components in dentin mineralization. *Crit. Rev. Oral Biol. Med.* 2:369–387.



Bosshardt DD (2005). Are cementoblasts a subpopulation of osteoblasts or a unique phenotype? *J. Dent. Res.* 84:390–406.

Bosshardt DD, Nanci A (2004). Hertwig's epithelial root sheath, enamel matrix proteins, and initiation of cementogenesis in porcine teeth. *J. Clin. Periodontol.* 31:184–192.

Brabletz T, Pfeuffer I, Schorr E, Siebelt F, Wirth T, Serfling E (1993). Transforming growth factor beta and cyclosporin A inhibit the inducible activity of the interleukin-2 gene in T cells through a noncanonical octamer-binding site. *Mol. Cell. Biol.* 13:1155–1162.

Brännström M (1966). Sensitivity of dentine. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.* 21:517–526.

Brar GS, Toor RSS (2012). Dental stem cells: dentinogenic, osteogenic, and neurogenic differentiation and its clinical cell based therapies. *Indian J Dent Res* 23:393–397.

Bronner-Fraser M (1993). Segregation of cell lineage in the neural crest. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 3:641–647.

Buchaille R, Couble M L, Magloire H, Bleicher F (2000). A subtractive PCR-based cDNA library from human odontoblast cells: identification of novel genes expressed in tooth forming cells. *Matrix Biol.* 19:421–430.

Butler PM (1956). The Ontogeny of Molar Pattern. *Biological Reviews* 31:30–69.

Byers MR (1984). Dental sensory receptors. *Int. Rev. Neurobiol.* 25:39–94.

Byers MR, Närhi MV (1999). Dental injury models: experimental tools for understanding neuroinflammatory interactions and polymodal nociceptor functions. *Crit. Rev. Oral Biol. Med.* 10:4–39.

Byers M R, Närhi MV, Dong WK (1987). Sensory innervation of pulp and dentin in adult dog teeth as demonstrated by autoradiography. *Anat. Rec.* 218:207–215.

Byers Margaret R, Suzuki H, Maeda Takeyasu (2003). Dental neuroplasticity, neuro-pulpal interactions, and nerve regeneration. *Microsc. Res. Tech.* 60:503–515.

Byers Margaret R., Maeda Takeyasu, Brown AM, Westenbroek RE (2004). GFAP immunoreactivity and transcription in trigeminal and dental tissues of rats and transgenic GFP/GFAP mice. *Microsc. Res. Tech.* 65:295–307.

Cahill DR (1969). Eruption pathway formation in the presence of experimental tooth impaction in puppies. *Anat. Rec.* 164:67–77.

Cam Y, Neumann MR, Ruch JV (1990). Immunolocalization of transforming growth factor beta 1 and epidermal growth factor receptor epitopes in mouse incisors and molars with a demonstration of in vitro production of transforming activity. *Arch. Oral Biol.* 35:813–822.

Carmeliet P (2003). Blood vessels and nerves: common signals, pathways and diseases. *Nat. Rev. Genet.* 4:710–720.

Casasco A, Calligaro A, Casasco M, Springall DR, Polak JM, Poggi P, et al. (1990). Peptidergic nerves in human dental pulp. An immunocytochemical study. *Histochemistry* 95:115–121.

Cauli B, Tong X-K, Rancillac A, Serluca N, Lambolez B, Rossier J, et al. (2004). Cortical GABA interneurons in neurovascular coupling: relays for subcortical vasoactive pathways. *J. Neurosci.* 24:8940–8949.

Chai Y, Jiang X, Ito Y, Bringas P Jr, Han J, Rowitch DH, et al. (2000). Fate of the mammalian cranial neural crest during tooth and mandibular morphogenesis. *Development* 127:1671–1679.

Cho S-W, Hwang H-J, Kim J-Y, Song W-C, Song S-J, Yamamoto H, et al. (2003). Lineage of non-cranial neural crest cell in the dental mesenchyme: using a lacZ reporter gene during early tooth development. *J Electron Microsc (Tokyo)* 52:567–571.

Chudler EH, Anderson LC, Byers M. R. (1997). Trigeminal ganglion neuronal activity and glial fibrillary acidic protein immunoreactivity after inferior alveolar nerve crush in the adult rat. *Pain* 73:141–149.

Cobourne MT, Sharpe PT (2005). Sonic hedgehog signaling and the developing tooth. *Curr. Top. Dev. Biol.* 65:255–287.

Cohen S (1962). Isolation of a mouse submaxillary gland protein accelerating incisor eruption and eyelid opening in the new-born animal. *J. Biol. Chem.* 237:1555–1562.

Coin R, Lesot H, Vonesch JL, Haikel Y, Ruch JV (1999). Aspects of cell proliferation kinetics of the inner dental epithelium during mouse molar and incisor morphogenesis: a reappraisal of the role of the enamel knot area. *Int. J. Dev. Biol.* 43:261–267.

De Couto Pita A, Passafaro D, Ganzinelli S, Borda E, Sterin-Borda L (2009). Differential cholinergic modulation of nitric oxide isoforms in experimentally-induced inflammation of dental pulp tissue. *International Endodontic Journal* 42:525–533.

Darian-Smith I (1973). The Trigeminal System. In A Iggo, editor. *Somatosensory System*. Handbook of Sensory Physiology. Springer Berlin Heidelberg, pp. 271–314.

Descasez V, Mestre E, Marquet P, Essig M (2012). Calcineurin regulation of cytoskeleton organization: a new paradigm to analyse the effects of calcineurin inhibitors on the kidney. *J. Cell. Mol. Med.* 16:218–227.

Diekwisch TG (2001). The developmental biology of cementum. *Int. J. Dev. Biol.* 45:695–706.

Diercke K, Zingler S, Kohl A, Lux CJ, Erber R Gene expression profile of compressed primary human cementoblasts before and after IL-1 $\beta$  stimulation. *Clin Oral Invest*:1–15.

Le Douarin N, Dulac C, Dupin E, Cameron-Curry P (1991). Glial cell lineages in the neural crest. *Glia* 4:175–184.

Egan CA, Hector MP, Bishop MA (1999). On the pulpal nerve supply in primary human teeth: evidence for the innervation of primary dentine. *Int J Paediatr Dent* 9:57–66.

Elhabazi A, Marie-Cardine A, Chabbert-de Ponnat I, Bensussan A, Boumsell L (2003). Structure and function of the immune semaphorin CD100/SEMA4D. *Crit. Rev. Immunol.* 23:65–81.

Ellis KM, O Carroll DC, Lewis MD, Rychkov GY, Koblar Simon A. (2014). Neurogenic potential of dental pulp stem cells isolated from murine incisors. *Stem Cell Res Ther* 5:30.

Farahani RM, Simonian M, Hunter N (2011). Blueprint of an ancestral neurosensory organ revealed in glial networks in human dental pulp. *J. Comp. Neurol.* 519:3306–3326.

Fincham AG, Moradian-Oldak J, Simmer JP (1999). The structural biology of the developing dental enamel matrix. *J. Struct. Biol.* 126:270–299.

Fiore R, Püschel AW (2003). The function of semaphorins during nervous system development. *Front. Biosci.* 8:s484–499.

Fleischmannova J, Matalova E, Sharpe P T, Misek I, Radlanski R J (2010). Formation of the tooth-bone interface. *J. Dent. Res.* 89:108–115.

Fried K, Risling M (1992). Growth-associated protein (GAP-43)-like immunoreactivity in primary and permanent tooth pulp nerve fibers of the cat. *Brain Res.* 572:19–26.

Fristad I, Heyeraas KJ, Kvinnsland I (1994). Nerve fibres and cells immunoreactive to neurochemical markers in developing rat molars and supporting tissues. *Arch. Oral Biol.* 39:633–646.

Fristad I, Jacobsen EB, Kvinnsland I H (1998). Coexpression of vasoactive intestinal polypeptide and substance P in reinnervating pulpal nerves and in trigeminal ganglion neurones after axotomy of the inferior alveolar nerve in the rat. *Arch. Oral Biol.* 43:183–189.

Gerli R, Secciani I, Sozio F, Rossi A, Weber E, Lorenzini G (2010). Absence of lymphatic vessels in human dental pulp: a morphological study. *Eur. J. Oral Sci.* 118:110–117.

Gibbs JL, Melnyk JL, Basbaum AI (2011). Differential TRPV1 and TRPV2 channel expression in dental pulp. *J. Dent. Res.* 90:765–770.

Gorantla VS, Barker JH, Jones JW, Prabhune K, Maldonado C, Granger DK (2000). Immunosuppressive agents in transplantation: mechanisms of action and current anti-rejection strategies. *Microsurgery* 20:420–429.

Gritli-Linde A, Bei M, Maas R, Zhang XM, Linde Anders, McMahon Andrew P (2002). Shh signaling within the dental epithelium is necessary for cell proliferation, growth and polarization. *Development* 129:5323–5337.

Groves MJ, Schänzer A, Simpson AJ, An S-F, Kuo LT, Scaravilli F (2003). Profile of adult rat sensory neuron loss, apoptosis and replacement after sciatic nerve crush. *J. Neurocytol.* 32:113–122.

Grunewald M, Avraham I, Dor Y, Bachar-Lustig E, Itin A, Jung S, et al. (2006). VEGF-induced adult neovascularization: recruitment, retention, and role of accessory cells. *Cell* 124:175–189.

Gunji T (1982). Morphological research on the sensitivity of dentin. *Arch Histol Jpn* 45:45–67.

Guseva D, Chelyshev Y (2006). The plasticity of the DRG neurons belonging to different subpopulations after dorsal rhizotomy. *Cell. Mol. Neurobiol.* 26:1225–1234.

Gutmann E, Sanders FK (1943). Recovery of fibre numbers and diameters in the regeneration of peripheral nerves. *J. Physiol. (Lond.)* 101:489–518.

Hamilton NB, Attwell D, Hall CN (2010). Pericyte-mediated regulation of capillary diameter: a component of neurovascular coupling in health and disease. *Front Neuroenergetics* 2.

Hanani M, Huang TY, Cherkas PS, Ledda M, Pannese E (2002). Glial cell plasticity in sensory ganglia induced by nerve damage. *Neuroscience* 114:279–283.

Hanani M (2005). Satellite glial cells in sensory ganglia: from form to function. *Brain Res. Brain Res. Rev.* 48:457–476.

Haug SR, Berggreen E, Heyeraas KJ (2001). The effect of unilateral sympathectomy and cavity preparation on peptidergic nerves and immune cells in rat dental pulp. *Exp. Neurol.* 169:182–190.

Haug SR, Heyeraas KJ (2006). Modulation of dental inflammation by the sympathetic nervous system. *J. Dent. Res.* 85:488–495.

Hermansteyne TO, Markowitz K, Fan L, Gold MS (2008). Mechanotransducers in rat pulpal afferents. *J. Dent. Res.* 87:834–838.

Heslot H (1998). Artificial fibrous proteins: a review. *Biochimie* 80:19–31.

Hildebrand C, Fried K, Tuisku F, Johansson CS (1995). Teeth and tooth nerves. *Prog. Neurobiol.* 45:165–222.

Hirschi KK, D'Amore PA (1996). Pericytes in the microvasculature. *Cardiovasc. Res.* 32:687–698.

Holland GR (1996). Experimental trigeminal nerve injury. *Crit. Rev. Oral Biol. Med.* 7:237–258.

Honda MJ, Fong H, Iwatsuki S, Sumita Y, Sarikaya M (2008). Tooth-forming potential in embryonic and postnatal tooth bud cells. *Med Mol Morphol* 41:183–192.



Honda MJ, Imaizumi M, Tsuchiya S, Morszeck C (2010). Dental follicle stem cells and tissue engineering. *J Oral Sci* 52:541–552.

Honda MJ, Ohara T, Sumita Y, Ogaeri T, Kagami H, Ueda M (2006). Preliminary study of tissue-engineered odontogenesis in the canine jaw. *J. Oral Maxillofac. Surg.* 64:283–289.

Hota PK, Buck M (2012). Plexin structures are coming: opportunities for multilevel investigations of semaphorin guidance receptors, their cell signaling mechanisms, and functions. *Cell. Mol. Life Sci.* 69:3765–3805.

Hovorakova M, Prochazka J, Lesot Herve, Smrckova L, Churava S, Boran T, et al. (2011). Shh expression in a rudimentary tooth offers new insights into development of the mouse incisor. *J. Exp. Zool. B Mol. Dev. Evol.* 316:347–358.

Hu B, Nadiri A, Bopp-Küchler S, Perrin-Schmitt F, Lesot H (2005b). Dental Epithelial Histomorphogenesis in vitro. *J. Dent. Res.* 84:521–525.

Hu B, Unda F, Bopp-Kuchler S, Jimenez L, Wang XJ, Haïkel Y, et al. (2006b). Bone marrow cells can give rise to ameloblast-like cells. *J. Dent. Res.* 85:416–421.

Hu B, Nadiri A, Bopp-Kuchler S, Perrin-Schmitt F, Wang S, Lesot H (2005a). Dental epithelial histo-morphogenesis in the mouse: positional information versus cell history. *Arch. Oral Biol.* 50:131–136.

Hu B, Nadiri A, Kuchler-Bopp S, Perrin-Schmitt F, Peters H, Lesot H (2006a). Tissue engineering of tooth crown, root, and periodontium. *Tissue Eng.* 12:2069–2075.

Huang George T.-J. (2011). Dental pulp and dentin tissue engineering and regeneration: advancement and challenge. *Front Biosci (Elite Ed)* 3:788–800.

Huo N, Tang L, Yang Z, Qian H, Wang Y, Han C, et al. (2010). Differentiation of Dermal Multipotent Cells Into Odontogenic Lineage Induced by Embryonic and Neonatal Tooth Germ Cell-Conditioned Medium. *Stem Cells and Development* 19:93–104.

Ibarra A, Hernández E, Lomeli J, Pineda D, Buenrostro M, Martiñón S, et al. (2007). Cyclosporin-A enhances non-functional axonal growing after complete spinal cord transection. *Brain Res.* 1149:200–209.

Ibuki T, Kido MA, Kiyoshima T, Terada Y, Tanaka T (1996). An ultrastructural study of the relationship between sensory trigeminal nerves and odontoblasts in rat dentin/pulp as demonstrated by the anterograde transport of wheat germ agglutinin-horseradish peroxidase (WGA-HRP). *J. Dent. Res.* 75:1963–1970.

Ichikawa H, Deguchi T, Nakago T, Jacobowitz DM, Sugimoto T (1995). Parvalbumin- and calretinin-immunoreactive trigeminal neurons innervating the rat molar tooth pulp. *Brain Res.* 679:205–211.

Iijima T, Zhang JQ (2002). Three-dimensional wall structure and the innervation of dental pulp blood vessels. *Microsc. Res. Tech.* 56:32–41.

Iizuka T, Cielinski M, Aukerman SL, Marks SC Jr (1992). The effects of colony-stimulating factor-1 on tooth eruption in the toothless (osteopetrotic) rat in relation to the critical periods for bone resorption during tooth eruption. *Arch. Oral Biol.* 37:629–636.

Ikeda E, Morita R, Nakao K, Ishida K, Nakamura T, Takano-Yamamoto T, et al. (2009). Fully functional bioengineered tooth replacement as an organ replacement therapy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 106:13475–13480.

Ikeda E, Tsuji T (2008). Growing bioengineered teeth from single cells: potential for dental regenerative medicine. *Expert Opin Biol Ther* 8:735–744.

Iwata T, Yamato M, Tsuchioka H, Takagi R, Mukobata S, Washio K, et al. (2009). Periodontal regeneration with multi-layered periodontal ligament-derived cell sheets in a canine model. *Biomaterials* 30:2716–2723.

Jernvall J, Aberg T, Kettunen P, Keränen S, Thesleff I (1998). The life history of an embryonic signaling center: BMP-4 induces p21 and is associated with apoptosis in the mouse tooth enamel knot. *Development* 125:161–169.

Jernvall J, Kettunen P, Karavanova I, Martin LB, Thesleff I (1994). Evidence for the role of the enamel knot as a control center in mammalian tooth cusp formation: non-dividing cells express growth stimulating Fgf-4 gene. *Int. J. Dev. Biol.* 38:463–469.

Jernvall J, Thesleff I (2000). Reiterative signaling and patterning during mammalian tooth morphogenesis. *Mech. Dev.* 92:19–29.

Jessen K. R., Mirsky R. (1998). Origin and early development of Schwann cells. *Microsc. Res. Tech.* 41:393–402.

Jessen K. R., Mirsky R. (1999). Schwann cells and their precursors emerge as major regulators of nerve development. *Trends Neurosci.* 22:402–410.

Jessen K. R., Mirsky R. (1992). Schwann cells: early lineage, regulation of proliferation and control of myelin formation. *Curr. Opin. Neurobiol.* 2:575–581.

Jontell M, Gunraj MN, Bergenholtz G (1987). Immunocompetent Cells in the Normal Dental Pulp. *J DENT RES* 66:1149–1153.

Karcher-Djuricic V, Staubli A, Meyer JM, Ruch JV (1985). Acellular dental matrices promote functional differentiation of ameloblasts. *Differentiation* 29:169–175.

Keller L, Kökten T, Kuchler-Bopp S, Lesot H (2014). Tooth organ engineering. In “*Stem Cell Biology and Tissue Engineering in Dental Sciences*”. (A. Vishwakarma, P. Sharpe, S. Shi, X.-P. Wang, M. Ramalingam, Eds). (In press : Accepted 03.03.2013).

Keller L, Kuchler-Bopp S, Lesot H (2012). Restoring physiological cell heterogeneity in the mesenchyme during tooth engineering. *Int. J. Dev. Biol.* 56:737–746.

Keller L., Kuchler-Bopp S., Lesot Hervé (2013). Whole-Tooth Engineering and Cell Sources. In George T.-J. Huang and Irma Thesleff, editors. *Stem Cells in Craniofacial Development and Regeneration*. John Wiley & Sons, Inc., pp. 431–446.

Keller L, Kuchler-Bopp S, Mendoza SA, Poliard A, Lesot H (2011). Tooth engineering: searching for dental mesenchymal cells sources. *Front Physiol* 2:7.

Kerezoudis NP, Olgart L, Edwall L, Gazelius B, Nomikos GG (1992). Activation of sympathetic fibres in the pulp by electrical stimulation of rat incisor teeth. *Arch. Oral Biol.* 37:1013–1019.

Kim JY, Xin X, Moioli EK, Chung J, Lee Chang Hun, Chen M, et al. (2010). Regeneration of dental-pulp-like tissue by chemotaxis-induced cell homing. *Tissue Eng Part A* 16:3023–3031.

Kim K, Lee C H, Kim BK, Mao J J (2010). Anatomically shaped tooth and periodontal regeneration by cell homing. *J. Dent. Res.* 89:842–847.

Klimczak A, Siemionow M (2007). Immune responses in transplantation: application to composite tissue allograft. *Semin Plast Surg* 21:226–233.

Kockx M, Jessup W, Kritharides L (2010). Cyclosporin A and atherosclerosis--cellular pathways in atherogenesis. *Pharmacol. Ther.* 128:106–118.

Kökten T, Lesot H and Kuchler-Bopp S (in press). Experimental Design for the Innervation of Tooth Forming from Implanted Cell Re-associations. In *In Tech : Regenerative Medicine and Tissue Engineering*", ISBN 978-953-51-4114-3, (In press : Accepted 24.09.2014).

Kökten T, Bécavin T, Keller Laetitia, Weickert J-L, Kuchler-Bopp Sabine, Lesot Hervé (2014). Immunomodulation stimulates the innervation of engineered tooth organ. *PLoS ONE* 9:e86011.

Kollar EJ, Baird GR (1969). The influence of the dental papilla on the development of tooth shape in embryonic mouse tooth germs. *J Embryol Exp Morphol* 21:131–148.

Kollar EJ, Baird GR (1970). Tissue interactions in embryonic mouse tooth germs. II. The inductive role of the dental papilla. *J Embryol Exp Morphol* 24:173–186.

Kolodkin A L, Levengood DV, Rowe EG, Tai YT, Giger RJ, Ginty DD (1997). Neuropilin is a semaphorin III receptor. *Cell* 90:753–762.

Kress M, Reeh PW (1996). More sensory competence for nociceptive neurons in culture. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93:14995–14997.

Kuchler-Bopp S, Keller L, Poliard A, Lesot H (2011). Tooth Organ Engineering: Biological Constraints Specifying Experimental Approaches. In D Eberli, editor. *Tissue Engineering for Tissue and Organ Regeneration*. InTech. [Accessed February 11, 2014]

Kukletová M, Zahrádka J, Lukáš Z (1968). Monoaminergic and cholinergic nerve fibres in the human dental pulp. *Histochemie* 16:154–158.

Kumanogoh A, Kikutani H (2010). Semaphorins and their receptors: novel features of neural guidance molecules. *Proc. Jpn. Acad., Ser. B, Phys. Biol. Sci.* 86:611–620.

Lagares A, Li H-Y, Zhou X-F, Avendaño C (2007). Primary sensory neuron addition in the adult rat trigeminal ganglion: evidence for neural crest glio-neuronal precursor maturation. *J. Neurosci.* 27:7939–7953.

Lesot H, Brook AH (2009). Epithelial histogenesis during tooth development. *Arch. Oral Biol.* 54 Suppl 1:S25–33.

Lesot H, Karcher-Djuricic V, Kubler MD, Ruch JV (1988). Membrane-cytoskeleton interactions: inhibition of odontoblast differentiation by a monoclonal antibody directed against a membrane protein. *Differentiation* 37:62–72.

Li HY, Say EHM, Zhou XF (2007). Isolation and characterization of neural crest progenitors from adult dorsal root ganglia. *Stem Cells* 25:2053–2065.

Li ZY, Chen Ling, Liu Lei, Lin YF, Li SW, Tian WD (2007). Odontogenic potential of bone marrow mesenchymal stem cells. *J. Oral Maxillofac. Surg.* 65:494–500.

Lilja J (1979). Innervation of different parts of the predentin and dentin in young human premolars. *Acta Odontol. Scand.* 37:339–346.

Lilja J, Nordenvall KJ, Bränström M (1982). Dentin sensitivity, odontoblasts and nerves under desiccated or infected experimental cavities. A clinical, light microscopic and ultrastructural investigation. *Swed Dent J* 6:93–103.

Lillesaar C, Arenas E, Hildebrand C, Fried K (2003). Responses of rat trigeminal neurones to dental pulp cells or fibroblasts overexpressing neurotrophic factors in vitro. *Neuroscience* 119:443–451.

Lillesaar C, Eriksson C, Fried K (2001). Rat tooth pulp cells elicit neurite growth from trigeminal neurones and express mRNAs for neurotrophic factors in vitro. *Neurosci. Lett.* 308:161–164.

Lillesaar C, Fried K (2004). Neurites from trigeminal ganglion explants grown in vitro are repelled or attracted by tooth-related tissues depending on developmental stage. *Neuroscience* 125:149–161.

Lin F, Fan W, Wise GE (1992). Granule proteins of the dental follicle and stellate reticulum inhibit tooth eruption and eyelid opening in postnatal rats. *Arch. Oral Biol.* 37:841–847.



- Linde A, Goldberg M (1993). Dentinogenesis. *Crit. Rev. Oral Biol. Med.* 4:679–728.
- Lisi S, Peterková R, Peterka M, Vonesch JL, Ruch JV, Lesot H (2003). Tooth morphogenesis and pattern of odontoblast differentiation. *Connect. Tissue Res.* 44 Suppl 1:167–170.
- Liu Y, Wang S, Shi S (2012). The role of recipient T cells in mesenchymal stem cell-based tissue regeneration. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 44:2044–2050.
- Løes S, Kettunen P, Kvinnsland H, Luukko K (2002). Mouse rudimentary diastema tooth primordia are devoid of peripheral nerve fibers. *Anat. Embryol.* 205:187–191.
- Løes S, Luukko K, Hals Kvinnsland I, Salminen M, Kettunen P (2003). Developmentally regulated expression of Netrin-1 and -3 in the embryonic mouse molar tooth germ. *Dev. Dyn.* 227:573–577.
- Lok J, Gupta P, Guo S, Kim WJ, Whalen MJ, Van Leyen K, et al. (2007). Cell-cell signaling in the neurovascular unit. *Neurochem. Res.* 32:2032–2045.
- Lumsden AG, Davies AM (1983). Earliest sensory nerve fibres are guided to peripheral targets by attractants other than nerve growth factor. *Nature* 306:786–788.
- Lungová V, Radlanski Ralf J, Tucker AS, Renz H, Míšek I, Matalová E (2011). Tooth-bone morphogenesis during postnatal stages of mouse first molar development. *J. Anat.* 218:699–716.
- Luukko K (1997). Immunohistochemical localization of nerve fibres during development of embryonic rat molar using peripherin and protein gene product 9.5 antibodies. *Arch. Oral Biol.* 42:189–195.
- Luukko K, Kvinnsland I-H, Kettunen P (2005). Tissue interactions in the regulation of axon pathfinding during tooth morphogenesis. *Dev. Dyn.* 234:482–488.
- Maeda T, Iwanaga T, Fujita T, Takahashi Y, Kobayashi S (1987). Distribution of nerve fibers immunoreactive to neurofilament protein in rat molars and periodontium. *Cell Tissue Res.* 249:13–23.
- Magloire H, Couble M-L (2011). [Biological dental implant: myth or reality?]. *Rev Stomatol Chir Maxillofac* 112:240–248.

Magloire H, Lesage F, Couble M L, Lazdunski M, Bleicher F (2003). Expression and localization of TREK-1 K<sup>+</sup> channels in human odontoblasts. *J. Dent. Res.* 82:542–545.

Magloire H., Couble M. -L. (2011). L’implant dentaire biologique : mythe ou réalité ? *Revue de Stomatologie et de Chirurgie Maxillo-faciale* 112:240–248.

Magloire H, Couble ML, Thivichon-Prince B, Maurin JC, Bleicher F (2009). Odontoblast: a mechano-sensory cell. *J. Exp. Zool. B Mol. Dev. Evol.* 312B:416–424.

Magloire H, Maurin JC, Couble ML, Shibukawa Y, Tsumura M, Thivichon-Prince B, et al. (2010). Topical review. Dental pain and odontoblasts: facts and hypotheses. *J Orofac Pain* 24:335–349.

Mahmood A, Wu H, Qu C, Xiong Y, Chopp M (2013). Effects of treating traumatic brain injury with collagen scaffolds and human bone marrow stromal cells on sprouting of corticospinal tract axons into the denervated side of the spinal cord. *J. Neurosurg.* 118:381–389.

Mantesso A, Sharpe P (2009). Dental stem cells for tooth regeneration and repair. *Expert Opin Biol Ther* 9:1143–1154.

Marchetti C, Poggi P, Calligaro A, Casasco A (1992). Lymphatic vessels of the human dental pulp in different conditions. *Anat. Rec.* 234:27–33.

Marks SC Jr (1983). The origin of osteoclasts: evidence, clinical implications and investigative challenges of an extra-skeletal source. *J. Oral Pathol.* 12:226–256.

Marks SC Jr, Cahill DR (1984). Experimental study in the dog of the non-active role of the tooth in the eruptive process. *Arch. Oral Biol.* 29:311–322.

Martin A, Gasse H, Staszyk C (2010). Absence of lymphatic vessels in the dog dental pulp: an immunohistochemical study. *J. Anat.* 217:609–615.

Maurin JC (2007). Mécanismes moléculaires de la sensibilité dentinaire. *Bull. Acad. Natle Chir. Dent* 50:29.

Maurin JC, Couble ML, Didier-Bazes M, Brisson C, Magloire H, Bleicher F (2004). Expression and localization of reelin in human odontoblasts. *Matrix Biol.* 23:277–285.

Maurin JC, Delorme G, Machuca-Gayet I, Couble ML, Magloire H, Jurdic P, et al. (2005). Odontoblast expression of semaphorin 7A during innervation of human dentin. *Matrix Biol.* 24:232–238.

McKee M d., Nanci A. (1996). Osteopontin at mineralized tissue interfaces in bone, teeth, and osseointegrated implants: Ultrastructural distribution and implications for mineralized tissue formation, turnover, and repair. *Microscopy Research and Technique* 33:141–164.

Mendes LF, Pirraco RP, Szymczyk W, Frias AM, Santos TC, Reis RL, et al. (2012). Perivascular-like cells contribute to the stability of the vascular network of osteogenic tissue formed from cell sheet-based constructs. *PLoS ONE* 7:e41051.

Miletich I, Sharpe PT (2004). Neural crest contribution to mammalian tooth formation. *Birth Defects Res. C Embryo Today* 72:200–212.

Miranda CO, Teixeira CA, Sousa VF, Santos TE, Liz MA, Marques AM, et al. (2014). Primary bone marrow mesenchymal stromal cells rescue the axonal phenotype of Twitcher mice. *Cell Transplant* 23:239–252.

Miroux C, Morales O, Ghazal K, Othman SB, De Launoit Y, Pancré V, et al. (2012). In vitro effects of cyclosporine A and tacrolimus on regulatory T-cell proliferation and function. *Transplantation* 94:123–131.

Mirsky R, Jessen KR., Brennan A, Parkinson D, Dong Z, Meier C, et al. (2002). Schwann cells as regulators of nerve development. *J. Physiol. Paris* 96:17–24.

Miura M, Gronthos S, Zhao M, Lu B, Fisher LW, Robey PG, et al. (2003). SHED: stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100:5807–5812.

Moe K, Kettunen P, Kvinnsland IH, Luukko K (2008). Development of the pioneer sympathetic innervation into the dental pulp of the mouse mandibular first molar. *Arch. Oral Biol.* 53:865–873.

Mohamed SS, Atkinson ME (1983). A histological study of the innervation of developing mouse teeth. *J. Anat.* 136:735–749.

Montori VM, Basu A, Erwin PJ, Velosa JA, Gabriel SE, Kudva YC (2002). Posttransplantation diabetes: a systematic review of the literature. *Diabetes Care* 25:583–592.

Morotomi T, Kawano S, Toyono T, Kitamura C, Terashita M, Uchida T, et al. (2005). In vitro differentiation of dental epithelial progenitor cells through epithelial-mesenchymal interactions. *Arch. Oral Biol.* 50:695–705.

Morton PD, Dellarole A, Theus MH, Walters WM, Berge SS, Bethea JR (2013). Activation of NF- $\kappa$ B in Schwann cells is dispensable for myelination in vivo. *J. Neurosci.* 33:9932–9936.

Moxham BJ, Berkovitz BK (1974). The effects of root transection on the unimpeded eruption rate of the rabbit mandibular incisor. *Arch. Oral Biol.* 19:903–909.

Mudie AS, Holland Graham Rex (2006). Local opioids in the inflamed dental pulp. *J Endod* 32:319–323.

Mukouyama Y, Shin D, Britsch S, Taniguchi M, Anderson DJ (2002). Sensory nerves determine the pattern of arterial differentiation and blood vessel branching in the skin. *Cell* 109:693–705.

Nagahama SI, Cunningham ML, Lee MY, Byers MR (1998). Normal development of dental innervation and nerve/tissue interactions in the colony-stimulating factor-1 deficient osteopetrotic mouse. *Dev. Dyn.* 211:52–59.

Nair PN (1995). Neural elements in dental pulp and dentin. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 80:710–719.

Nait Lechguer A, Couble ML, Labert N, Kuchler-Bopp S, Keller L, Magloire H, et al. (2011). Cell Differentiation and Matrix Organization in Engineered Teeth. *J DENT RES* 90:583–589.

Nait Lechguer A (2010). Thèse Adnane Nait-Lechguer. Available at: <http://scd-theses.u-strasbg.fr/1906/> [Accessed April 2, 2014]

Nait Lechguer A, Kuchler-Bopp S, Hu B, Haïkel Y, Lesot H (2008). Vascularization of engineered teeth. *J. Dent. Res.* 87:1138–1143.

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

Nakagawa E, Itoh T, Yoshie H, Satokata I (2009). Odontogenic potential of post-natal oral mucosal epithelium. *J. Dent. Res.* 88:219–223.

Nakao K, Morita R, Saji Y, Ishida K, Tomita Y, Ogawa M, et al. (2007). The development of a bioengineered organ germ method. *Nat. Methods* 4:227–230.

Nakashima M, Akamine A (2005). The application of tissue engineering to regeneration of pulp and dentin in endodontics. *J Endod* 31:711–718.

Nakashima M, Iohara K, Sugiyama M (2009). Human dental pulp stem cells with highly angiogenic and neurogenic potential for possible use in pulp regeneration. *Cytokine Growth Factor Rev.* 20:435–440.

Nakatomi M, Morita I, Eto K, Ota MS (2006). Sonic hedgehog signaling is important in tooth root development. *J. Dent. Res.* 85:427–431.

Nassery K, Marino V, Parker DAS (2007). Uptake and release of [(3)H]GABA in human dental pulp. *Arch. Oral Biol.* 52:607–613.

Nehls V, Drenckhahn D (1993). The versatility of microvascular pericytes: from mesenchyme to smooth muscle? *Histochemistry* 99:1–12.

Neufeld G, Cohen T, Gengrinovitch S, Poltorak Z (1999). Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. *FASEB J.* 13:9–22.

Nosrat CA, Fried K, Ebendal T, Olson L (1998). NGF, BDNF, NT3, NT4 and GDNF in tooth development. *Eur. J. Oral Sci.* 106 Suppl 1:94–99.

Obara N, Lesot Hervé (2007). Asymmetrical growth, differential cell proliferation, and dynamic cell rearrangement underlie epithelial morphogenesis in mouse molar development. *Cell Tissue Res.* 330:461–473.

Ohara T, Itaya T, Usami K, Ando Y, Sakurai H, Honda MJ, et al. (2010). Evaluation of scaffold materials for tooth tissue engineering. *J Biomed Mater Res A* 94:800–805.

Ohazama A, Modino SAC, Miletich I, Sharpe P T (2004). Stem-cell-based tissue engineering of murine teeth. *J. Dent. Res.* 83:518–522.

Olgart L (1996). Neural control of pulpal blood flow. *Crit. Rev. Oral Biol. Med.* 7:159–171.



- Olgart LM, Edwall B, Gazelius B (1989). Neurogenic mediators in control of pulpal blood flow. *J Endod* 15:409–412.
- Olyaei AJ, De Mattos AM, Bennett WM (2001). Nephrotoxicity of immunosuppressive drugs: new insight and preventive strategies. *Curr Opin Crit Care* 7:384–389.
- Oshima M, Mizuno M, Imamura A, Ogawa M, Yasukawa M, Yamazaki H, et al. (2011). Functional tooth regeneration using a bioengineered tooth unit as a mature organ replacement regenerative therapy. *PLoS ONE* 6:e21531.
- Oshima S, Watanabe M (2012). Elevated expression of calcineurin subunits during active mineralization of developing mouse molar teeth. *Eur. J. Oral Sci.* 120:386–394.
- Oswald RJ, Byers M R (1993). The injury response of pulpal NPY-IR sympathetic fibers differs from that of sensory afferent fibers. *Neurosci. Lett.* 164:190–194.
- Otsu K, Kishigami R, Oikawa-Sasaki A, Fukumoto S, Yamada A, Fujiwara N, et al. (2012). Differentiation of induced pluripotent stem cells into dental mesenchymal cells. *Stem Cells Dev.* 21:1156–1164.
- Otsu K, Kumakami-Sakano M, Fujiwara N, Kikuchi K, Keller Laetitia, Lesot Hervé, et al. (2014). Stem cell sources for tooth regeneration: current status and future prospects. *Front Physiol* 5:36.
- Páli J, Négyessy L (2002). Reinnervation of a single vibrissa after nerve excision in the adult rat. *Neuroreport* 13:1743–1746.
- Palosaari H, Pennington CJ, Larmas M, Edwards DR, Tjäderhane L, Salo T (2003). Expression profile of matrix metalloproteinases (MMPs) and tissue inhibitors of MMPs in mature human odontoblasts and pulp tissue. *Eur. J. Oral Sci.* 111:117–127.
- Pan Z, Fukuoka S, Karagianni N, Guaiquil VH, Rosenblatt MI (2013). Vascular endothelial growth factor promotes anatomical and functional recovery of injured peripheral nerves in the avascular cornea. *FASEB J.* 27:2756–2767.
- Pannese E (1981). The satellite cells of the sensory ganglia. *Adv Anat Embryol Cell Biol* 65:1–111.

Park SH, Hsiao GY-W, Huang G T-J (2004). Role of substance P and calcitonin gene-related peptide in the regulation of interleukin-8 and monocyte chemotactic protein-1 expression in human dental pulp. *Int Endod J* 37:185–192.

Pasterkamp RJ, Peschon JJ, Spriggs MK, Kolodkin Alex L (2003). Semaphorin 7A promotes axon outgrowth through integrins and MAPKs. *Nature* 424:398–405.

Pastor AM, Delgado-García JM, Martínez-Guijarro FJ, López-García C, De La Cruz RR (2000). Response of abducens internuclear neurons to axotomy in the adult cat. *J. Comp. Neurol.* 427:370–390.

Peterková R, Lesot H, Vonesch JL, Peterka M, Ruch JV (1996). Mouse molar morphogenesis revisited by three dimensional reconstruction. I. Analysis of initial stages of the first upper molar development revealed two transient buds. *Int. J. Dev. Biol.* 40:1009–1016.

Peterkova R, Lesot H, Peterka Miroslav (2006). Phylogenetic memory of developing mammalian dentition. *Journal of Experimental Zoology Part B: Molecular and Developmental Evolution* 306B:234–250.

Peterková R, Peterka M, Viriot L, Lesot H (2002). Development of the vestigial tooth primordia as part of mouse odontogenesis. *Connect. Tissue Res.* 43:120–128.

Peterková Renata, Peterka Miroslav, Lesot Hervé (2003). The developing mouse dentition: a new tool for apoptosis study. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1010:453–466.

Peters H, Balling R (1999). Teeth. Where and how to make them. *Trends Genet.* 15:59–65.

Piette É, Goldberg Michel (2001). La dent normale et pathologique. De Boeck Supérieur.

Pimenta FJGS, Sá AR, Gomez RS (2003). Lymphangiogenesis in human dental pulp. *Int Endod J* 36:853–856.

Pohto P, Antila R (1968). Demonstration of adrenergic nerve fibres in human dental pulp by histochemical fluorescence method. *Acta Odontol. Scand.* 26:137–144.

Pohto P, Antila R (1972). Innervation of blood vessels in the dental pulp. *Int Dent J* 22:228–239.

Pool M, Rambaldi I, Darlington PJ, Wright MC, Fournier AE, Bar-Or A (2012). Neurite outgrowth is differentially impacted by distinct immune cell subsets. *Mol. Cell. Neurosci.* 49:68–76.

Potapova IA, Brink PR, Cohen IS, Doronin SV (2008). Culturing of human mesenchymal stem cells as three-dimensional aggregates induces functional expression of CXCR4 that regulates adhesion to endothelial cells. *Journal of Biological Chemistry* 283:13100–13107.

Pourtois M (1961). [Contribution to the study of tooth buds in the mouse. I. Periods of induction and morphodifferentiation]. *Arch Biol (Liege)* 72:17–95.

Qian XB, Naftel JP (1996). Effects of neonatal exposure to anti-nerve growth factor on the number and size distribution of trigeminal neurones projecting to the molar dental pulp in rats. *Arch. Oral Biol.* 41:359–367.

Que BG, Wise GE (1998). Tooth eruption molecules enhance MCP-1 gene expression in the dental follicle of the rat. *Dev. Dyn.* 212:346–351.

Ramasamy R, Fazekasova H, Lam EW-F, Soeiro I, Lombardi G, Dazzi F (2007). Mesenchymal stem cells inhibit dendritic cell differentiation and function by preventing entry into the cell cycle. *Transplantation* 83:71–76.

Ridet JL, Malhotra SK, Privat A, Gage FH (1997). Reactive astrocytes: cellular and molecular cues to biological function. *Trends Neurosci.* 20:570–577.

Rincon JC, Young WG, Bartold P M (2006). The epithelial cell rests of Malassez--a role in periodontal regeneration? *J. Periodont. Res.* 41:245–252.

Robert N, Wong GW, Wright JM (2010). Effect of cyclosporine on blood pressure. *Cochrane Database Syst Rev*:CD007893.

Robinson C, Kirkham J, Brookes SJ, Bonass WA, Shore RC (1995). The chemistry of enamel development. *Int. J. Dev. Biol.* 39:145–152.

Rodd HD, Boissonade FM (2003). Immunocytochemical investigation of neurovascular relationships in human tooth pulp. *J. Anat.* 202:195–203.

Rothová M, Feng J, Sharpe PT, Peterková R, Tucker AS (2011). Contribution of mesoderm to the developing dental papilla. *Int. J. Dev. Biol.* 55:59–64.

Roufail E, Stringer M, Rees S (1995). Nitric oxide synthase immunoreactivity and NADPH diaphorase staining are co-localised in neurons closely associated with the vasculature in rat and human retina. *Brain Res.* 684:36–46.

Ruch JV (1987). Determinisms of odontogenesis. *Revis. Biol. Celular* 14:1–99.

Ruch JV (1998). Odontoblast commitment and differentiation. *Biochem. Cell Biol.* 76:923–938.

Ruch JV, Lesot H, Karcher-Djuricic V, Meyer JM, Mark M (1983). Epithelial-mesenchymal interactions in tooth germs: mechanisms of differentiation. *J Biol Buccale* 11:173–193.

Salazar-Ciudad I, Jernvall Jukka (2002). A gene network model accounting for development and evolution of mammalian teeth. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99:8116–8120.

Sasano T, Shoji N, Kuriwada S, Sanjo D, Izumi H, Karita K (1995). Absence of parasympathetic vasodilatation in cat dental pulp. *J. Dent. Res.* 74:1665–1670.

Satoh-Kuriwada S, Sasano T, Date H, Karita K, Izumi H, Shoji N, et al. (2003). Centrally mediated reflex vasodilation in the gingiva induced by painful tooth-pulp stimulation in sympathectomized human subjects. *J. Periodont. Res.* 38:218–222.

Sawa Y, Yoshida S, Ashikaga Y, Kim T, Yamaoka Y, Suzuki M (1998). Immunohistochemical demonstration of lymphatic vessels in human dental pulp. *Tissue Cell* 30:510–516.

Schratzberger P, Walter DH, Rittig K, Bahlmann FH, Pola R, Curry C, et al. (2001). Reversal of experimental diabetic neuropathy by VEGF gene transfer. *J. Clin. Invest.* 107:1083–1092.

Serpe CJ, Coers S, Sanders VM, Jones KJ (2003). CD4+ T, but not CD8+ or B, lymphocytes mediate facial motoneuron survival after facial nerve transection. *Brain Behav. Immun.* 17:393–402.

Shi S, Gronthos S (2003). Perivascular niche of postnatal mesenchymal stem cells in human bone marrow and dental pulp. *J. Bone Miner. Res.* 18:696–704.

Shimeno Y, Sugawara Y, Iikubo M, Shoji N, Sasano T (2008). Sympathetic nerve fibers sprout into rat odontoblast layer, but not into dentinal tubules, in response to cavity preparation. *Neurosci. Lett.* 435:73–77.

Shin GT, Khanna A, Ding R, Sharma VK, Lagman M, Li B, et al. (1998). In vivo expression of transforming growth factor-beta1 in humans: stimulation by cyclosporine. *Transplantation* 65:313–318.

Siemionow M, Gharb BB, Rampazzo A (2011). Pathways of sensory recovery after face transplantation. *Plast. Reconstr. Surg.* 127:1875–1889.

Sims DE (2000). Diversity within pericytes. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 27:842–846.

Sims MR (1987). Ultrastructure of the venous ampulla in the interradicular microvascular bed of the mandibular molars of *Mus musculus*. *J. Morphol.* 191:217–224.

Slavkin HC (1990). Regulatory issues during early craniofacial development: a summary. *The Cleft Palate-Craniofacial Journal* 27:101–109.

Son AR, Yang YM, Hong JH, Lee SI, Shibukawa Y, Shin DM (2009). Odontoblast TRP channels and thermo/mechanical transmission. *J. Dent. Res.* 88:1014–1019.

Steindorff MM, Lehl H, Winkel A, Stiesch M (2014). Innovative approaches to regenerate teeth by tissue engineering. *Arch. Oral Biol.* 59:158–166.

Stephenson JL, Byers M. R. (1995). GFAP immunoreactivity in trigeminal ganglion satellite cells after tooth injury in rats. *Exp. Neurol.* 131:11–22.

Sterin-Borda L, Furlan C, Reina S, Orman B, Borda E (2007). Differential signalling pathways involved in cholinceptor-dependent stimulation of nitric oxide isoforms in dental pulp. *International Endodontic Journal* 40:544–552.

Thesleff I, Sharpe P. (1997). Signalling networks regulating dental development. *Mech. Dev.* 67:111–123.

Thisse C, Zon LI (2002). Organogenesis--heart and blood formation from the zebrafish point of view. *Science* 295:457–462.



Tummers M, Thesleff Irma (2003). Root or crown: a developmental choice orchestrated by the differential regulation of the epithelial stem cell niche in the tooth of two rodent species. *Development* 130:1049–1057.

Tummers M, Thesleff Irma (2009). The importance of signal pathway modulation in all aspects of tooth development. *J. Exp. Zool. B Mol. Dev. Evol.* 312B:309–319.

Uccelli A, Pistoia V, Moretta L (2007). Mesenchymal stem cells: a new strategy for immunosuppression? *Trends Immunol.* 28:219–226.

Uddman R, Björlin G, Möller B, Sundler F (1980). Occurrence of VIP nerves in mammalian dental pulps. *Acta Odontol. Scand.* 38:325–328.

Vahtokari A, Aberg T, Jernvall J, Keränen S, Thesleff I (1996). The enamel knot as a signaling center in the developing mouse tooth. *Mech. Dev.* 54:39–43.

Viriot L, Peterková R, Vonesch JL, Peterka M, Ruch JV, Lesot H (1997). Mouse molar morphogenesis revisited by three-dimensional reconstruction. III. Spatial distribution of mitoses and apoptoses up to bell-staged first lower molar teeth. *Int. J. Dev. Biol.* 41:679–690.

Vogel DY, Heijnen PD, Breur M, De Vries HE, Tool AT, Amor S, et al. (2014). Macrophages migrate in an activation-dependent manner to chemokines involved in neuroinflammation. *J Neuroinflammation* 11:23.

Volponi AA, Pang Y, Sharpe Paul T (2010). Stem cell-based biological tooth repair and regeneration. *Trends Cell Biol.* 20:715–722.

Vyklický L, Knotková-Urbancová H (1996). Can sensory neurones in culture serve as a model of nociception? *Physiol Res* 45:1–9.

Wada N, Gronthos S, Bartold P. Mark (2013). Immunomodulatory effects of stem cells. *Periodontol. 2000* 63:198–216.

Wada N, Menicanin D, Shi Songtao, Bartold P Mark, Gronthos S (2009). Immunomodulatory properties of human periodontal ligament stem cells. *J. Cell. Physiol.* 219:667–676.

Wakisaka S, Ichikawa H, Nishikawa S, Matsuo S, Takano Y, Akai M (1987). Immunohistochemical observation on the correlation between substance P- and vasoactive

intestinal polypeptide-like immunoreactivities in the feline dental pulp. *Arch. Oral Biol.* 32:449–453.

Wang B, Li L, Du S, Liu C, Lin X, Chen Y, et al. (2010). Induction of human keratinocytes into enamel-secreting ameloblasts. *Dev. Biol.* 344:795–799.

Watkins S, Robel S, Kimbrough IF, Robert SM, Ellis-Davies G, Sontheimer H (2014). Disruption of astrocyte-vascular coupling and the blood-brain barrier by invading glioma cells. *Nat Commun* 5:4196.

Wei X, Ling J, Wu L, Liu Lu, Xiao Y (2007). Expression of mineralization markers in dental pulp cells. *J Endod* 33:703–708.

Wen Z, Guirland C, Ming G-L, Zheng JQ (2004). A CaMKII/calcineurin switch controls the direction of Ca(2+)-dependent growth cone guidance. *Neuron* 43:835–846.

Widenfalk J, Lipson A, Jubran M, Hofstetter C, Ebendal T, Cao Y, et al. (2003). Vascular endothelial growth factor improves functional outcome and decreases secondary degeneration in experimental spinal cord contusion injury. *Neuroscience* 120:951–960.

Wise GE, Frazier-Bowers S, D’Souza RN (2002). Cellular, molecular, and genetic determinants of tooth eruption. *Crit. Rev. Oral Biol. Med.* 13:323–334.

Wise GE, Lin F, Fan W (1992). Culture and characterization of dental follicle cells from rat molars. *Cell Tissue Res.* 267:483–492.

Yamamoto T, Li M, Liu Z, Guo Y, Hasegawa T, Masuki H, et al. (2010). Histological review of the human cellular cementum with special reference to an alternating lamellar pattern. *Odontology* 98:102–109.

Yamaza T, Kentaro A, Chen C, Liu Y, Shi Yufang, Gronthos S, et al. (2010). Immunomodulatory properties of stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *Stem Cell Res Ther* 1:5.

Yang C, Lee J-S, Jung U-W, Seo Y-K, Park J-K, Choi S-H (2013). Periodontal regeneration with nano-hydroxyapatite-coated silk scaffolds in dogs. *J Periodontal Implant Sci* 43:315–322.

Yang F, Cui W, Xiong Z, Liu Li, Bei J, Wang Shenguo (2006). Poly(l,l-lactide-co-glycolide)/tricalcium phosphate composite scaffold and its various changes during degradation in vitro. *Polymer Degradation and Stability* 91:3065–3073.

Yen AH-H, Sharpe PT (2008). Stem cells and tooth tissue engineering. *Cell Tissue Res.* 331:359–372.

Yoshida S, Ohshima H (1996). Distribution and organization of peripheral capillaries in dental pulp and their relationship to odontoblasts. *Anat. Rec.* 245:313–326.

Young CS, Kim SW, Qin C, Baba O, Butler WT, Taylor RR, et al. (2005). Developmental analysis and computer modelling of bioengineered teeth. *Arch. Oral Biol.* 50:259–265.

Yu CY, Boyd NM, Cringle SJ, Su EN, Alder VA, Yu DY (2002). An in vivo and in vitro comparison of the effects of vasoactive mediators on pulpal blood vessels in rat incisors. *Arch. Oral Biol.* 47:723–732.

Yu J, Shi J, Jin Yan (2008). Current approaches and challenges in making a bio-tooth. *Tissue Eng Part B Rev* 14:307–319.

Zhang JQ, Nagata K, Iijima T. (1998). Scanning electron microscopy and immunohistochemical observations of the vascular nerve plexuses in the dental pulp of rat incisor. *Anat. Rec.* 251:214–220.

Zhang W, Ge W, Li C, You S, Liao L, Han Q, et al. (2004). Effects of mesenchymal stem cells on differentiation, maturation, and function of human monocyte-derived dendritic cells. *Stem Cells Dev.* 13:263–271.

Zhang W, Ahluwalia IP, Yelick PC (2010). Three dimensional dental epithelial-mesenchymal constructs of predetermined size and shape for tooth regeneration. *Biomaterials* 31:7995–8003.

Zhang YD, Chen Z, Song YQ, Liu C, Chen YP (2005). Making a tooth: growth factors, transcription factors, and stem cells. *Cell Res.* 15:301–316.

Zhao H, Feng J, Seidel K, Shi Songtao, Klein O, Sharpe P, et al. (2014). Secretion of shh by a neurovascular bundle niche supports mesenchymal stem cell homeostasis in the adult mouse incisor. *Cell Stem Cell* 14:160–173.

Zhao Y, Wang L, Jin Y, Shi S (2012). Fas ligand regulates the immunomodulatory properties of dental pulp stem cells. *J. Dent. Res.* 91:948–954.

Zheng L, Yang F, Shen H, Hu X, Mochizuki C, Sato M, et al. (2011). The effect of composition of calcium phosphate composite scaffolds on the formation of tooth tissue from human dental pulp stem cells. *Biomaterials* 32:7053–7059.

Zhou J, Shi S, Shi Y, Xie H, Chen L, He Y, et al. (2011). Role of bone marrow-derived progenitor cells in the maintenance and regeneration of dental mesenchymal tissues. *J. Cell. Physiol.* 226:2081–2090.

Zuchero JB (2014). Purification and culture of dorsal root ganglion neurons. *Cold Spring Harb Protoc* 2014:pdb.top073965.

## ▪ Liste des publications

**Kökten T., Lesot H. and Kuchler-Bopp S (in press). Experimental Design for the Innervation of Tooth Forming from Implanted Cell Re-associations. In In Tech : Regenerative Medicine and Tissue Engineering", ISBN 978-953-51-4114-3, (In press : Accepted 24.09.2014).**

**Kökten T, Bécavin T, Keller L, Weickert J-L, Kuchler-Bopp S, Lesot H (2014). Immunomodulation stimulates the innervation of engineered tooth organ. PLoS ONE 9:e86011.**

Keller L., **Kökten T.**, Kuchler-Bopp S., Lesot H (2014). **Tooth organ engineering. In "Stem Cell Biology and Tissue Engineering in Dental Sciences". (A. Vishwakarma, P. Sharpe, S. Shi, X.-P. Wang, M. Ramalingam, Eds). (In press : Accepted 03.03.2013).**

**Kökten T, Eap S, Bécavin T, Keller L, Fioretti F, Weickert J-L, et al. (2014). Nanofibers implant functionalized by neural growth factor as a strategy to innervate a bioengineered tooth. Adv. Healthc. Mater. 3:386–391.**

Kuchler-Bopp S, Bécavin T, **Kökten T**, Fioretti F, Deveau E, Benkirane-Jessel N, et al. (2013). **Nanostructured hybrid materials for bone-tooth unit regeneration. Open Journal of Regenerative Medicine 02:47–52.**

## ▪ Liste des communications

**Septembre 2013 : Forum des jeunes chercheurs en odontologie/Collège National des Enseignants en Science Biologiques Odontologiques (CNESBO).**

**Kökten T, Keller LV, Kuchler-Bopp S, Lesot H. Restoring physiological cell heterogeneity in the mesenchyme during tooth engineering. Int J Dev Biol. 2012; 56(9): 737-46.**

**Juin 2013 : Journées Scientifiques de la Fédération de Médecine Translationnelle de Strasbourg (FMTS).**

**Kökten T, Keller LV, Kuchler-Bopp S, Lesot H. Restoring physiological cell heterogeneity in the mesenchyme during tooth engineering. Int J Dev Biol. 2012; 56(9): 737-46.**



# Tunay KÖKTEN

## L'innervation en ingénierie dentaire

### RESUME

Notre approche biomimétique permet de régénérer une dent entière. Un protocole en deux étapes à partir de réassociations de cellules dentaires embryonnaires permet le développement de la couronne *in vitro* et, après implantation, la différenciation fonctionnelle des cellules, l'initiation du développement radiculaire et la vascularisation dentaire. Cependant, l'absence d'innervation a nécessité des expériences complémentaires :

- La co-implantation de réassociations cellulaires avec un ganglion trigéminal permet la croissance d'axones autour de la dent formée, mais pas dans le mésenchyme dentaire.
- Pour tenter de résoudre ce problème, la régénération axonale a été testée dans un contexte immunodéprimé en utilisant la cyclosporine A (CsA). Dans ces conditions, des fibres nerveuses entrent dans la pulpe dentaire, jusqu'aux odontoblastes. Cependant, la CsA a aussi un effet direct sur la croissance axonale.
- Des co-implantations chez des souris immunodéprimées (Nude) montrent que l'immunomodulation seule suffit pour l'innervation de la dent.
- Dans la dent, les axones assurent différentes fonctions en interagissant avec les cellules voisines. Les relations entre axones et autres cellules (odontoblastes, cellules endothéliales, péricytes et cellules gliales) ont été analysées dans les mésenchymes dentaire et péri-dentaire de réassociations implantées et comparées à ce que l'on observe pour une molaire physiologique à un stade similaire.

Ce travail décrit les conditions permettant l'innervation des dents régénérées. Des expériences préliminaires encourageantes ont été réalisées avec des cellules souches pour remplacer la CsA.

**Mots clés :** Ingénierie de l'organe dentaire, innervation, vascularisation, cellules gliales, immunomodulation, souris.

### ABSTRACT

Our biomimetic approach allowed the regeneration of a whole tooth. Using embryonic dental cells, a two-steps protocol allowed crown formation *in vitro* and, after implantation, functional cells differentiation, initiation of root formation and tooth vascularization. However, the teeth were not innervated, which led to complementary experiments:

- The co-implantation of cell re-associations with a trigeminal ganglion allowed axonal growth around the forming teeth, but not in the dental mesenchyme.
- To try to solve this point, axonal regeneration was tested in immunodepressed conditions, using cyclosporin A (CsA). In these conditions, nerve fibers entered the dental pulp and reached odontoblasts. However, CsA shows multiple effects, including direct ones on nerve growth.
- Co-implantations were performed in immunocompromised Nude mice allowed axons to reach the odontoblast layer, thus showing that immunomodulation is sufficient.
- Axons in the dental mesenchyme interfere with several functions by interacting with neighbor cells. Relationships between axons and other cells (odontoblasts, endothelial cells, pericytes and glial cells) were analyzed in the peridental and dental mesenchymes of implanted reassociations and compared to the physiological situation in developing molars at similar stage.

This work describes conditions allowing the innervation of engineered teeth. Preliminary encouraging attempts have been made to replace CsA by using stem cells.

**Key words:** Tooth organ engineering, innervation, vascularization, glial cells, immunomodulation, mouse.

# Tunay KÖKTEN

## L'innervation en ingénierie dentaire

### RESUME

Notre approche biomimétique permet de régénérer une dent entière. Un protocole en deux étapes à partir de réassociations de cellules dentaires embryonnaires permet le développement de la couronne *in vitro* et, après implantation, la différenciation fonctionnelle des cellules, l'initiation du développement radiculaire et la vascularisation dentaire. Cependant, l'absence d'innervation a nécessité des expériences complémentaires :

- La co-implantation de réassociations cellulaires avec un ganglion trigéminal permet la croissance d'axones autour de la dent formée, mais pas dans le mésenchyme dentaire.
- Pour tenter de résoudre ce problème, la régénération axonale a été testée dans un contexte immunodéprimé en utilisant la cyclosporine A (CsA). Dans ces conditions, des fibres nerveuses entrent dans la pulpe dentaire, jusqu'aux odontoblastes. Cependant, la CsA a aussi un effet direct sur la croissance axonale.
- Des co-implantations chez des souris immunodéprimées (Nude) montrent que l'immunomodulation seule suffit pour l'innervation de la dent.
- Dans la dent, les axones assurent différentes fonctions en interagissant avec les cellules voisines. Les relations entre axones et autres cellules (odontoblastes, cellules endothéliales, péricytes et cellules gliales) ont été analysées dans les mésenchymes dentaire et péri-dentaire de réassociations implantées et comparées à ce que l'on observe pour une molaire physiologique à un stade similaire.

Ce travail décrit les conditions permettant l'innervation des dents régénérées. Des expériences préliminaires encourageantes ont été réalisées avec des cellules souches pour remplacer la CsA.

**Mots clés :** Ingénierie de l'organe dentaire, innervation, vascularisation, cellules gliales, immunomodulation, souris.

### ABSTRACT

Our biomimetic approach allowed the regeneration of a whole tooth. Using embryonic dental cells, a two-steps protocol allowed crown formation *in vitro* and, after implantation, functional cells differentiation, initiation of root formation and tooth vascularization. However, the teeth were not innervated, which led to complementary experiments:

- The co-implantation of cell re-associations with a trigeminal ganglion allowed axonal growth around the forming teeth, but not in the dental mesenchyme.
- To try to solve this point, axonal regeneration was tested in immunodepressed conditions, using cyclosporin A (CsA). In these conditions, nerve fibers entered the dental pulp and reached odontoblasts. However, CsA shows multiple effects, including direct ones on nerve growth.
- Co-implantations were performed in immunocompromised Nude mice allowed axons to reach the odontoblast layer, thus showing that immunomodulation is sufficient.
- Axons in the dental mesenchyme interfere with several functions by interacting with neighbor cells. Relationships between axons and other cells (odontoblasts, endothelial cells, pericytes and glial cells) were analyzed in the peridental and dental mesenchymes of implanted reassociations and compared to the physiological situation in developing molars at similar stage.

This work describes conditions allowing the innervation of engineered teeth. Preliminary encouraging attempts have been made to replace CsA by using stem cells.

**Key words:** Tooth organ engineering, innervation, vascularization, glial cells, immunomodulation, mouse.