

**Thèse présentée pour obtenir le grade de  
Docteur de l'Université de Strasbourg**

Sciences du vivant: Aspects Moléculaires  
et Cellulaires de la Biologie

par **Adnane NAIT LECHGUER**

**INGENIERIE DE L'ORGANE DENTAIRE A PARTIR DE CELLULES  
DISSOCIEES : MORPHOGENESE CORONAIRE,  
VASCULARISATION ET INNERVATION.**

Soutenue publiquement le 1<sup>er</sup> octobre, 2010

Membres du jury

<b>Directeur de Thèse</b>	<b>:</b>	<b>Dr. Hervé LESOT, Strasbourg</b>
<b>Co-Directeur de Thèse</b>	<b>:</b>	<b>Prof. Latifa TRICHA, Maroc</b>
<b>Rapporteur Interne</b>	<b>:</b>	<b>Prof. Joëlle OGIER, Strasbourg</b>
<b>Rapporteur Externe</b>	<b>:</b>	<b>Prof. Anne POLIARD, Paris</b>
<b>Rapporteur Externe</b>	<b>:</b>	<b>Prof. Henry MAGLOIRE, Lyon</b>
<b>Examineur</b>	<b>:</b>	<b>Prof. Youssef HAÏKEL, Strasbourg</b>



# Remerciements

---

Ce travail de thèse a été effectué à l'UMR INSERM qui est devenue UMR 977 depuis 2009 et intitulée : biomatériaux et ingénierie tissulaire. En premier lieu, je voudrais remercier le **Docteur Jean-Claude Voegel** directeur de cette unité, pour m'avoir permis d'y effectuer ma thèse. Je remercie le **Docteur Hervé Lesot**, de m'avoir accueilli dans son équipe et de m'avoir donné tous les moyens pour effectuer ce travail. En particulier je voudrais souligner la liberté qu'il m'a laissée dans mon travail de recherche. Mes remerciements vont également au **Professeur Latifa Tricha** pour sa participation à la co-direction de cette thèse.

A Mesdames et Messieurs les membres du jury qui m'ont fait l'honneur de juger ce travail :

- **Professeur Joëlle Ogier**, je tiens à vous remercier pour votre soutien au laboratoire et en clinique.
- **Professeur Youssef Haïkel**, un grand merci pour votre confiance, votre soutien et vos encouragements, au cours de toutes ces années passées à la Faculté de chirurgie dentaire de l'université de Strasbourg.
- **Professeur Anne Poliard**, merci d'avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse.
- **Professeur Henry Magloire**, tous mes remerciements, pour votre soutien, votre gentillesse et votre disponibilité lors de nos échanges de courriers.

Cette thèse a été financée successivement par l'Université de Strasbourg, l'INSERM, et finalement par l'IFRO. Je tiens à remercier ces organismes de leur soutien financier.

Mes remerciements vont aussi au secrétariat de notre UMR, Madame Christiane Bouthier, ainsi qu'à tous le personnel de la Faculté de chirurgie dentaire, en particulier Madame Janine Kempler et Madame Anne Rigaud ; au personnel de l'école doctorale particulièrement au Professeur Catherine Florentz et Madame Fanny Hummel ; et au personnel du bureau des études doctorales de l'université de Strasbourg, pour leur aide dans les démarches administratives.

Merci aussi à toute l'équipe du Dr Lesot pour la très bonne ambiance dans laquelle ce travail s'est fait et les nombreux échanges enrichissants que nous avons eus particulièrement avec mon amie et collègue Dr Sabine Kuchler-Bopp et pour ses corrections de mon travail de thèse, à Dr Bing Hu avec qui j'ai eu plaisir de travailler, à Monsieur Hervé Gegout pour l'histologie de qualité, au Dr Yves Cam pour sa gentillesse et qui est déjà à la retraite depuis quelques mois, au Professeur Mathieu Schmittbuhl à Monsieur Jean Jacques Flück le futur retraité, au Dr Fabienne Perrin-Schmitt, au Dr François Clauss, au Dr Catherine-Isabelle Gros, au Dr Fabien Bornert et enfin à Mlle Laetitia Keller le futur docteur de notre équipe.

Et à toutes les personnes que j'ai eu le plaisir de côtoyer quotidiennement au laboratoire :

En premier Dr Nadia Jessel et son équipe, Dr Philippe Laval et son équipe, Dr Bernard Senger, Professeur Vincent Ball, Dr Florence Fioretti, Professeur Denis Selimovic, Dr Martine Soell, Dr Carlos Mendoza, Dr Joseph Hemmerlé, Cosette Betscha, Dr Sybille Facca, Dr Dominique Vautier, Leyla Kocgozlu, Armelle Chassepot, Dr Olivier Huck, Professeur Jean-Luc Davideau, Dr René Elkaim, Alae Eddine El Haitami, Falk Bernsmann, Professeur Henri Tenenbaum, Christine Affolter, Géraldine Koenig, Dr Nadia Ladhari, Eric Mathieu, Dr Isabelle Nguyen, Cedric Vogt, Dr Florent Meyer, Christian Ringwald, ainsi qu'à tous les membres du laboratoire passés que j'ai eu plaisir de croiser, en particulier Dr Gregory Francius, et Dr Erell Le Guen, Professeur Sandra Werner, Florian Bombard, Dr Hajare Mjahed, Dr Sabine Muller, Jan Günter, Pierre Bindel, Alain Ackermann, Dr Maria Dimitrova, Dr Amal Nadiri, Dr Géraldine Greiner, Dr Pauline Noubissié.

Et le personnel de l'animalerie : Jacky, Julien, Mohammed, Claudia, Christophe, Marie et Christiane, sans eux ce travail n'aurait pas pu être réalisé.

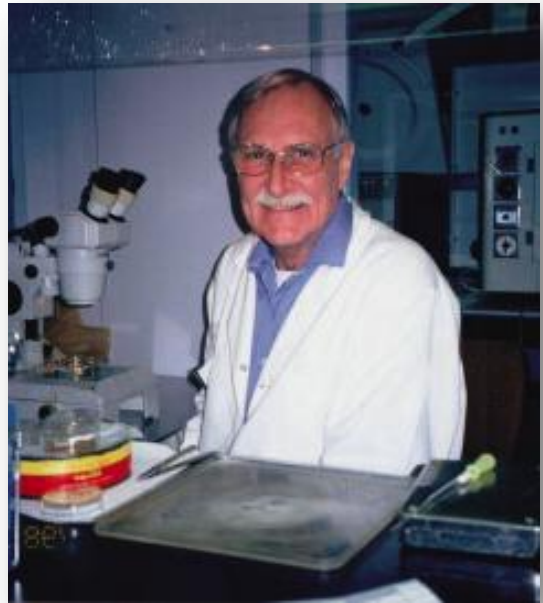
Et surtout Monsieur Raymond Langs sans lui aucun appareil ne fonctionnera dans ce laboratoire.

Enfin, je tiens à remercier toute ma famille et mes amis qui m'ont beaucoup soutenu au cours de ces années de thèse.

# Avant-propos

---

En 1969, après avoir passé sa thèse, Jean Victor Ruch rechercha un nouveau projet concernant les interactions épithélio-mésenchymateuses pour étudier leur rôle dans le développement. Il choisit la dent comme modèle et mit au point les cultures de germes dentaires *in vitro* et testa plusieurs types de réassociations tissulaires. Il s'intéressa surtout aux rôles de la prolifération cellulaire dans la détermination de la taille d'un organe. De nombreuses collaborations ont été initiées afin d'apprendre à d'autres chercheurs le prélèvement des germes dentaires chez la souris et les techniques de culture *in vitro*. Il a contribué à déterminer le rôle de la membrane basale dans les interactions entre améloblastes et odontoblastes et le contrôle de la différenciation des odontoblastes.



*Prof. Jean-Victor RUCH  
(1935-2003)*

Pour sa contribution scientifique reconnue au niveau international, il reçut en 1991 à Göteborg le titre de « Odontologic Doctor Honoris Causa ». Il garda toujours d'étroites relations avec l'Université de Göteborg. Il est à l'origine du COST et TMD, qui permet encore actuellement de regrouper les différentes équipes de recherche odontologiques européennes.

Sa chaude personnalité, son humilité ont fait du Prof. Ruch un mentor naturel pour beaucoup de jeunes chercheurs, auxquels il a transmis sa passion de la recherche et son savoir faire. Toujours prêt à donner des conseils, disponible pour discuter des résultats et donner des idées pour la suite des travaux...

Dr Sabine Kuchler-Bopp

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Bopp'.



# TABLE DES MATIERES

<b>I. INTRODUCTION</b>	<b>5</b>
<b>II. RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES</b>	<b>8</b>
<b>II.1. Médecine régénérative et ingénierie tissulaire</b>	<b>9</b>
<b>II.2. Ingénierie tissulaire dentaire</b>	<b>9</b>
<b>II.3. Rappel de l'odontogenèse chez la souris</b>	<b>10</b>
○ Stades initiaux :	13
○ Stade de bourgeon dentaire :	13
○ Stade de capuchon :	13
○ Le nœud de l'émail primaire :	14
○ Stade de la cloche :	15
a) Membrane basale	15
b) Différenciation terminale des odontoblastes et des améloblastes	16
c) Le sac folliculaire	17
d) Email : composition et structure	18
○ Caractéristiques physico-chimiques de l'émail	18
○ Minéralisation de l'émail	19
e) Complexe pulpo-dentinaire	20
○ La pulpe	20
○ Composition, formation et structure de la dentine	21
○ Types de dentine	21
f) Formation de la racine	22
○ Le Cément	23
g) L'éruption dentaire	24
○ Mécanismes d'éruption de la dent	24
<b>II.4. Vascularisation</b>	<b>25</b>
a) Mise en place du réseau vasculaire	25

<b>II.5. Innervation</b>	<b>27</b>
a) Anatomo-physiologie de l'innervation dentaire	27
b) Le système trigéminal chez la souris	28
c) Contrôle de l'innervation	30
o Croissance axonale	30
o Guidage axonal	30
<b>III. MATERIEL ET METHODES</b>	<b>32</b>
a) Matériel	33
b) Prélèvement des germes dentaires	33
c) Dissociations tissulaires	33
d) Cultures <i>in vitro</i>	34
e) Implantation	35
f) Immunofluorescence	35
g) Histologie	36
<b>IV. RESULTATS</b>	<b>37</b>
<b>IV.1. LA VASCULARISATION</b>	<b>38</b>
a) But du travail	39
b) Résultats et discussion	40
<b>IV.2. L'INNERVATION</b>	<b>53</b>
a) Objectifs de cette étude	54
b) Matériel et méthodes	55
o Prélèvement des ganglions dorsaux (dorsal root ganglion, DRG)	55
o Co-culture	55
o Implantation	56
c) Résultats	58
o Innervation des réassociations cellules-cellules après implantation	58
o Innervation des germes molaires intacts après implantation	58
o Mise en place de l'innervation au cours du développement dentaire <i>ex vivo</i> .	60
o Localisations de molécules régulant l'innervation au cours du développement dentaire <i>ex vivo</i>	63
o Possibilité de l'innervation au cours du développement dentaire dans les cultures <i>in vitro</i>	65
d) Discussion	69



<b>IV.3. FORMATION DES COURONNES DENTAIRES AU COURS DU DEVELOPPEMENT ET D'INGENIERIE TISSULAIRE</b>	<b>74</b>
a) Acquisition de la morphologie de la couronne dentaire	74
b) Recherche d'une ressource cellulaire non dentaire	76
c) Résultats complémentaires	88
<b>V. DISCUSSION ET CONCLUSION GENERALES</b>	<b>92</b>
<b>VI ANNEXES</b>	<b>97</b>
<b>VII REFERENCES</b>	<b>130</b>

## FIGURES

<b>Figure 1 :</b> Microtomographie (Micro CT) du crâne et de la mandibule de souris adulte CD-1 : on distingue une incisive, un diastème et trois molaires par demi-mâchoire (images prises par le Dr F. Bornnert). -----	11
<b>Figure 2 :</b> Coupes histologiques des différents stades de développement de la première molaire inférieure (M <sub>1</sub> ) de souris. Ep : épithélium, Mes : mésenchyme, PD : pulpe dentaire -----	12
<b>Figure 3 :</b> Anatomie simplifiée du nerf trijumeau (V): Le nerf ophtalmique de Willis (V-1), le nerf maxillaire (V-2) et le nerf mandibulaire (V-3) -----	28
<b>Figure 4 :</b> Développement de l'innervation au cours du développement de la première molaire chez la souris d'après Luukko et coll., (2005). -----	29
<b>Figure 5 :</b> Prélèvement et dissociations tissulaires des germes de la première molaire inférieure -----	34
<b>Figure 6 :</b> Immunolocalisation de la périphérine sur coupes congelées de réassociations CE/CM cultivées 8 jours et implantées de 7 jours. -----	58
<b>Figure 7 :</b> Immunolocalisation de la périphérine sur coupes congelées de réassociations CE/CM cultivées 8 jours et implantées de 2 semaines. -----	59
<b>Figure 8 :</b> Immunolocalisation de la périphérine sur coupes congelées de germes de la première molaire inférieure prélevé à 14 j, cultivées 7 jours et implantées 7j. -----	60
<b>Figure 9 :</b> Mise en place de l'innervation durant le développement dentaire ex vivo -----	62
<b>Figure 10 :</b> Immunolocalisation de la SEMA 3A sur coupes congelées des germes de premières molaires inférieures de E15 et E17. -----	63
<b>Figure 11 :</b> Immunolocalisation de la SEMA 7A sur coupes congelées des germes de premières molaires inférieures de E19 et PN2. -----	64
<b>Figure 12 :</b> Immunolocalisation de p75 et NGF sur coupes congelées des germes de premières molaires inférieures à PN2. -----	65
<b>Figure 13 :</b> Co-culture de germes de première molaire inférieure E14 avec des DRG (prélevés chez les embryons de 10 jours) pendant 6 jours sur milieu semi-solide. -----	66
<b>Figure 14 :</b> Immunolocalisation de la périphérine sur des coupes congelées des co-cultures des germes des premières molaires inférieurs et les DRG in vitro et après implantation. -----	67
<b>Figure 15 :</b> Immunolocalisation de la périphérine sur des coupes congelées des germes des premières molaires inférieures prélevés à PN5 et après 4 semaines d'implantation. -----	68
<b>Figure 16 :</b> Image macro des réassociations entre Ep 14 et BMC à j-0 après 1 et 3 jours de culture. -----	89
<b>Figure 17 :</b> culture des réassociations entre Ep 14 et BMC -----	90

## ABBREVIATIONS

**Am:** Améloblastes

**BMC :** Bone marrow cells

**BMP:** Bone morphogenetic protein

**BMPR:** Bone morphogenetic protein receptor

**CE/CM:** Cellules épithéliales/cellules mésenchymateuses

**DP, PD:** Pulpe dentaire

**DPSC:** Dental Pulp Stem cells

**DRG:** Dorsal root ganglion

**ED:** Embryonic day

**EDE:** Epithélium dentaire externe

**EDI:** Epithélium dentaire interne

**EGF:** Epidermal growth factor

**FGF:** Fibroblast growth factor

**FN:** Fibres nerveuses

**Gb:** gubernaculum

**GDNF:** Glial cell line-derived

**GFP:** Green Fluorescent Protein

**HSPG :** Protéoglycanes à héparane sulfate

**IGF:** Insulin-like growth factor

**IL:** Interleukine

**JED:** Jonction émail-dentine

**LC:** Lèvre cervicale

**LEF-1:** lymphoid enhancer-binding factor-1

**MB:** membrane basale

**MB:** Membrane basale

**MD:** Mésenchyme dentaire

**MEC:** Matrice extracellulaire

**NAI:** Nerf alvéolaire inférieur

**NEP:** noeud de l'émail primaire

**NES:** noeuds de l'émail secondaires

**NGF:** nerve growth factor

**Od:** Odontoblastes

**OE:** Organe de l'émail

**p75:** Neurotrophin Receptor

**PDECGF:** Platelet-derived endothelial cell growth factor

**PDGF:** Platelet-derived growth factor

**PECAM:** platelet/endothelial cell adhesion molecule

**RS:** réticulum stellaire

**SEMA:** Semaphorine

**SF:** Sac folliculaire

**Shh:** Sonic hedgehog

**SI:** stratum intermedium

**TGF-alpha:** transforming growth factor-alpha

**TGF-beta:** transforming growth factor-beta

**Trk-R:** Tyrosine kinase receptor

**Trk:** Tyrosine kinase

**VEGF-R:** Vascular endothelial growth factor receptor

**VEGF:** Vascular endothelial growth factor

**WNT:** Wingless

# **I. INTRODUCTION**

Pour remplacer, maintenir ou améliorer la fonction d'un tissu ou d'un organe déficient, l'ingénierie tissulaire est un des domaines les plus prometteurs de la médecine régénérative. Son but est de mettre au point de nouvelles méthodes utilisant des cellules vivantes et/ou des matériaux (synthétiques ou naturels) afin de réparer ou reconstruire un tissu ou un organe qui sera implanté et fonctionnalisé *in vivo*. Ainsi, de nouvelles stratégies thérapeutiques sont actuellement proposées et expérimentées dans le but de régénérer la peau, le cartilage, l'os, le muscle, ... et plus récemment la dent.

La reconstitution d'une dent entière est un défi majeur de la médecine régénérative (Smith, 2004). Différentes approches sont développées dans plusieurs laboratoires dans le monde. Certains utilisent des « scaffolds » préformés pour guider la croissance et la morphogenèse de l'organe dentaire (Young et coll., 2002), d'autres utilisent des méthodes biomimétiques pour reproduire les différentes étapes de la croissance de l'organe dentaire. Dans notre laboratoire, nous avons opté pour des méthodes biomimétiques, ce qui nécessite une bonne connaissance du développement physiologique de la dent.

Depuis 40 ans, le développement dentaire est étudié par notre l'équipe de recherche. Tous ces travaux ont été initiés par le Professeur Jean Victor Ruch. Au cours de ces dernières années, le modèle d'ingénierie dentaire élaboré dans notre unité de recherche, permet d'obtenir à partir de réassociations entre cellules épithéliales et cellules mésenchymateuses le développement des couronnes dentaires *in vitro* avec l'histogenèse épithéliale et la différenciation des odontoblastes et des améloblastes (Hu et coll. 2005 a,b). Après implantation en sous-cutané chez la souris adulte de ces réassociations cultivées, il est possible d'obtenir le début de la formation de racines, du système d'ancrage, et aussi une meilleure apposition de la dentine et de l'émail (Hu et coll., 2006 a). Plus récemment, des travaux ont été menés pour rechercher des ressources cellulaires non dentaires. Les résultats montrent que selon leur position dans les réassociations, les cellules souches de la moelle osseuse (c-kit +) sont capables de se différencier en cellules de type améloblastique et en cellules de type odontoblastique (Hu et coll., 2006 b). Ainsi, nous disposons d'un ensemble d'approches expérimentales et d'une stratégie d'ingénierie dentaire globale permettant le

développement d'un organe dentaire entier. Pour continuer dans cette voie, nous avons analysé trois points importants et complémentaires :

- La possibilité de vasculariser les réassociations après implantation, indispensable à la survie et la fonctionnalité de la dent.
- La possibilité d'innover les réassociations après implantation, essentiel à l'homéostasie, la sensibilité, et proprioception indispensables au fonctionnement de la dent et des mâchoires.
- L'action du mésenchyme, où sont stockées des molécules de signalisation sécrétées par les cellules épithéliales, sur le contrôle de la morphogenèse dentaire. La question principale était de savoir si le mésenchyme pouvait spécifier les caractéristiques du nœud de l'émail primaire (NEP), centre épithélial de signalisation impliquée dans le contrôle de la morphogenèse.
- Les potentialités morphogènes des cellules de la moelle osseuse pour remplacer le mésenchyme dentaire des molaires au stade capuchon. L'identification récente de cellules souches adultes et leur capacité à se différencier pour former divers tissus, représente une avancée significative et a contribué au développement de l'ingénierie dentaire. Les cellules de la moelle osseuse ont la capacité de se différencier en cellules dentaires (Ohazama et coll., 2004 ; Hu et coll., 2006 b). Nous avons testé leur aptitude à induire la formation du NEP.

## **II. RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES**

## **II.1. Médecine régénérative et ingénierie tissulaire**

La régénération physiologique des organes entiers est courante chez la plupart des plantes et chez certains animaux tels que les diblastiques (ex : hydre) et amphibiens, qui peuvent remplacer des organes endommagés par des organes neo-formés fonctionnels (Barker et Beck. 2009). Chez les mammifères, cette capacité de régénération est limitée à certains tissus possédant des cellules souches ou multipotentes capables de se différencier et réparer les parties lésées des tissus et organes (Austin et Lagasse, 2003 ; Grove et coll., 2004).

La médecine régénérative vise à réparer des organes ou des tissus altérés. Elle regroupe deux domaines : la thérapie cellulaire et l'ingénierie tissulaire :

- La thérapie cellulaire est basée sur l'utilisation des cellules souches, capables de remplacer différents types de cellules dysfonctionnelles dans le but de réparer des tissus ou des organes fragilisés (Orlic et coll., 2001) ;
- L'ingénierie tissulaire est un des domaines de la biotechnologie, dont le but est de reconstruire, régénérer un nouveau tissu ou organe, destiné à remplacer, maintenir ou améliorer la fonction de tissus ou d'organes déficients (Nichols et Cortiella, 2008 ; Atala, 2009).

La médecine régénérative utilisée actuellement dans plusieurs domaines, peut grandement améliorer les thérapies actuelles, qui reposent principalement sur le remplacement du tissu ou de l'organe défaillant par une prothèse, et proposer une solution durable à une multitude de problèmes cliniques.

## **II.2. Ingénierie tissulaire dentaire**

L'ingénierie dentaire vise à régénérer des dents complètes en partant des cellules (Bluteau et coll., 2008). Ces dernières années, des avancées majeures ont été réalisées dans ce domaine. Des résultats obtenus chez le rat et le porc montrent que des structures similaires à



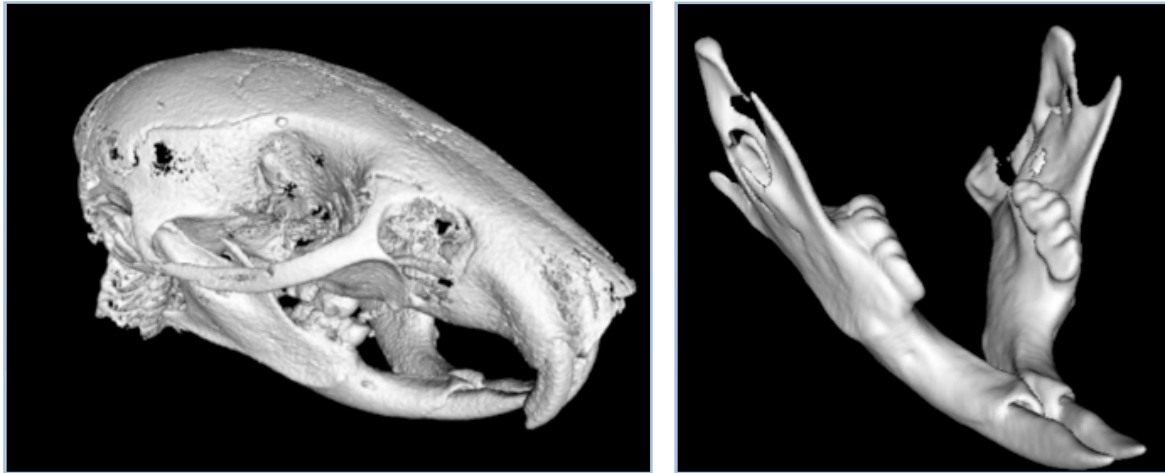
la dent (formation d'émail et de dentine) peuvent être formées à partir de cellules de germes dentaires déposées sur des supports biodégradables mais sans arriver à obtenir une forme coronaire correcte ni le développement des racines (Young et coll., 2002 et 2005 ; Duailibi et coll., 2004). Des travaux chez la souris ont abouti au développement d'ébauches dentaires *in vitro* à partir de cellules de la moelle osseuse réassociées avec l'épithélium dentaire : après implantation de ces réassociations chez l'adulte des couronnes dentaires se forment (Ohazama et coll., 2004).

Nous avons opté pour le modèle de biomimétisme afin de mettre au point une stratégie d'ingénierie dentaire (Hu et coll., 2005 a,b, 2006 a,b). Donc, la compréhension du développement normal de la dent est indispensable.

### **II.3. Rappel de l'odontogenèse chez la souris**

Chez les rongeurs, la denture présente un certain nombre de spécificités. En particulier, les incisives des deux mâchoires sont à croissance continue. Les canines sont absentes. Chez l'adulte, un grand diastème sépare les incisives des molaires (Fig. 1).

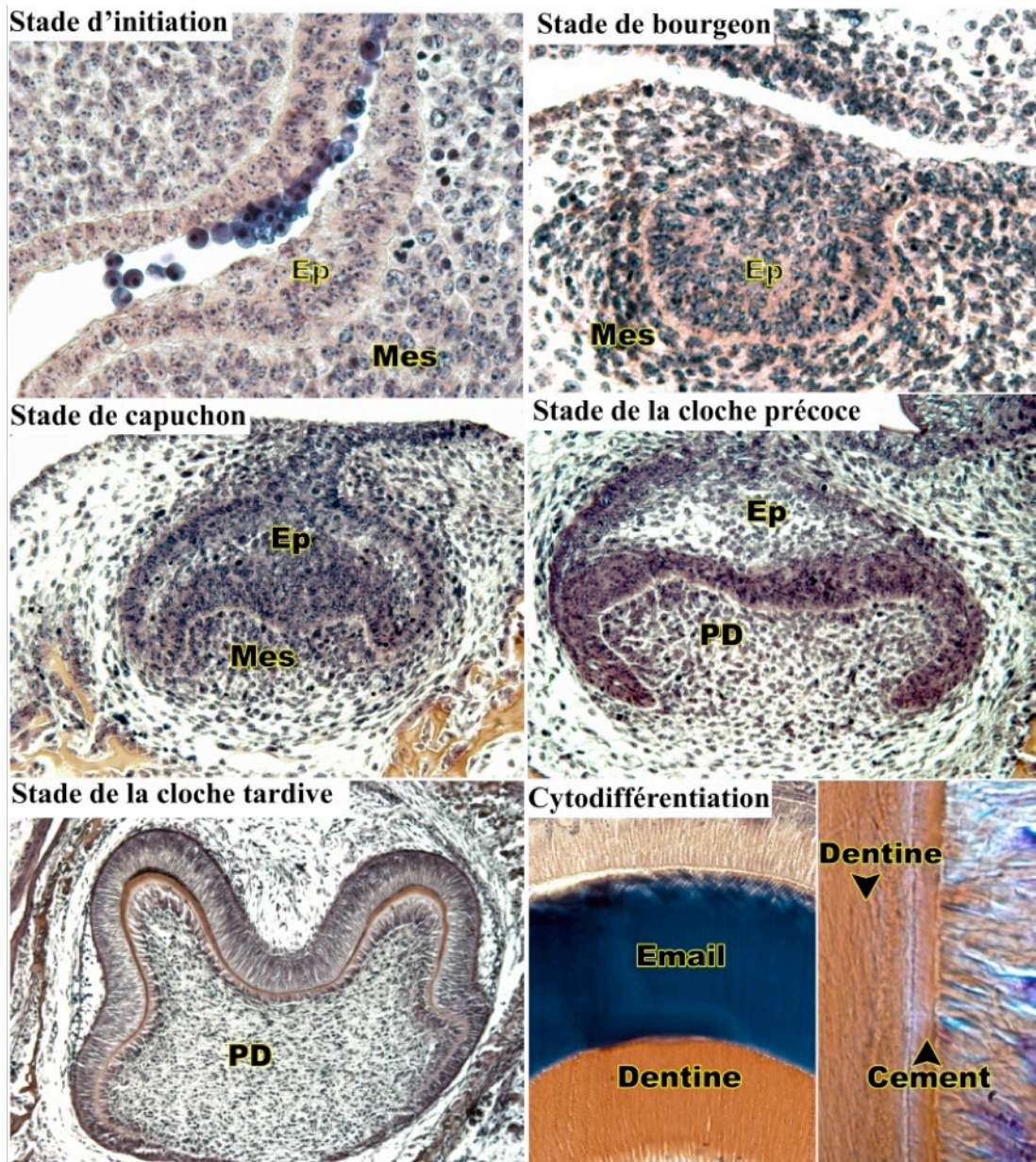
Chez la souris, chaque demi-mâchoire comporte trois molaires multicuspidées (Fig. 1). Leur croissance est limitée, contrairement à ce qu'on observe pour l'incisive. L'incisive est une dent monocuspidée, elle se développe selon un axe antéro-postérieur où la partie la plus postérieure présente l'activité mitotique la plus élevée.



**Figure 1** : Microtomographie (Micro CT) du crâne et de la mandibule de souris adulte CD-1 : on distingue une incisive, un diastème et trois molaires par demi-mâchoire (images prises par le Dr F. Bornnert).

Les dents sont des organes dont la partie mésenchymateuse dérive des cellules de la crête neurale et la partie épithéliale de l'ectoderme (Miletich et Sharpe, 2004). L'odontogenèse est contrôlée par des interactions épithélio-mésenchymateuses réciproques et continues durant tout le développement embryonnaire (Ruch et coll., 1995 ; Maas et Bei, 1997 ; Thesleff et Sharpe, 1997 ; Peters et Balling, 1999). Le développement de la dent débute par une phase d'initiation déterminant dans l'arc mandibulaire et maxillaire des régions spécifiques pour chaque classe de dents et aboutissant à la formation de la lame dentaire. Puis intervient une phase de morphogenèse qui est un processus multifactoriel impliquant des mécanismes d'apoptose (Peterkova et coll., 2003), de prolifération et de migration cellulaires (Gritli-Linde et coll., 2002). Cette phase est caractérisée par différents stades (lame, bourgeon, capuchon, cloche) et suivie d'une phase de cytodifférenciation où les cellules mésenchymateuses et de l'épithélium dentaire au contact de la membrane basale deviennent respectivement des odontoblastes et des améloblastes. Ces cellules fonctionnelles sécrètent respectivement la prédentine et la dentine pour les odontoblastes (Ruch et coll., 1995; Smith et Lesot, 2001) et les composants de l'émail pour les améloblastes (Robinson et coll., 1998) (Fig. 2). La phase finale est la formation des racines qui se produit à la fin de la formation coronaire. Elle est tributaire de la progression apicale de la lèvre épithéliale constituant la gaine de Hertwig formée par l'accolement de l'épithélium dentaire interne (EDI) et de l'épithélium dentaire externe (EDE). Au contact de l'EDI, les préodontoblastes se

différencient en odontoblastes fonctionnels et déposent une matrice de prédentine-dentine. Au contact de la prédentine-dentine, les cémentoblastes se différencient et déposent le ciment (Diekwisch, 2001; Bosshardt, 2005). Enfin, l'éruption dentaire fait intervenir des phénomènes de remodelage osseux localisés (Marks et Schroeder, 1996).



**Figure 2:** Coupes histologiques des différents stades de développement de la première molaire inférieure ( $M_1$ ) de souris. Ep : épithélium, Mes : mésenchyme, PD : pulpe dentaire

### **a) La morphogenèse de la couronne de la première molaire inférieure (M<sub>1</sub>)**

#### **○ Stades initiaux :**

La première manifestation morphologique du développement de la première molaire inférieure au niveau des arcs mandibulaire et maxillaire apparaît au 11<sup>ème</sup> jour du développement embryonnaire (Fig. 2). Des zones spécifiques de l'épithélium oral s'épaississent et forment la lame dentaire. Ces zones d'épaississement sont composées de 4 à 5 couches cellulaires appelées placode dentaire ou odontogène. Le développement de la lame dentaire ne semble pas résulter d'activités mitotiques différentielles mais d'un changement d'orientation des fuseaux mitotiques des cellules épithéliales. Les fuseaux mitotiques tendent à s'orienter perpendiculairement à la membrane basale (Ruch, 1985 ; Peterkova et coll., 1996).

#### **○ Stade de bourgeon dentaire :**

Au 13<sup>ème</sup> jour embryonnaire, l'épithélium de la lame dentaire devient plus massif et s'invagine dans le mésenchyme sous-jacent grâce à la prolifération des cellules de la couche basale et aux actions d'enzymatiques qui dégradent la matrice extracellulaire mésenchymateuse (Fig. 2). En même temps, le mésenchyme se condense par l'augmentation de la prolifération de ses cellules et formera la future pulpe dentaire et le mésenchyme périodentaire.

#### **○ Stade de capuchon :**

Au jour 14, le bourgeon épithélial s'aplatit sur le mésenchyme condensé et prend la forme d'un capuchon. Les bords de l'épithélium (la lèvre cervicale) prolifèrent activement et progressivement vont délimiter la pulpe dentaire. La progression de l'histogenèse épithéliale conduit à l'apparition de l'épithélium dentaire interne (EDI) et l'épithélium dentaire externe (EDE). Les cellules de l'EDI situées au contact du mésenchyme dentaire sont initialement pseudo-stratifiées. L'EDE se compose d'une seule couche de cellules cubiques. Progressivement, le réticulum stellaire (RS) et le stratum intermedium (SI) vont se

différencier (Fig. 2). Le RS s'interpose entre l'EDE et le SI. Les cellules de forme étoilée du RS sont séparées les unes des autres par de grands espaces extracellulaires riches en glycosaminoglycanes, qui constituent une réserve énergétique importante pour l'organe de l'émail. Le SI est formé d'une à deux couches de cellules aplaties en contact étroit avec les cellules de l'EDI (Coin et coll., 1999). A partir du stade de capuchon, lors du développement de la lèvre cervicale, une activité mitotique différentielle apparaît : l'EDI possède une activité mitotique plus importante que celle de l'EDE.

- **Le nœud de l'émail primaire :**

Lors du passage du stade du bourgeon au stade du capuchon, une structure transitoire (un amas cellulaire) appelée le nœud de l'émail primaire (NEP) apparaît au centre de l'organe de l'émail. Ce NEP a été décrit histologiquement pour la première fois, il y a plus d'un siècle. Il est caractérisé par un arrangement concentrique des cellules épithéliales localisées au niveau de la dépression du capuchon dentaire. Ce NEP est formé de deux types cellulaires : 1) des cellules en contact avec la membrane basale en continuité avec les cellules de l'EDI (Obara et Lesot, 2004) et 2) des cellules internes plus petites. Les cellules à la périphérie du NEP sont arrangées de manière concentrique. Le NEP est composé de cellules ne proliférant plus et de cellules apoptotiques (Jernvall et coll., 1994 ; Lesot et coll., 1996 ; Coin et coll., 1999). Les cellules du NEP expriment différentes molécules de signalisation : Shh (sonic hedgehog), des FGF (fibroblast growth factor), des BMP (bone morphogenetic protein), et des WNT (Wingless), (Vaahtokari et coll., 1996 ; Keranen et coll., 1998 ; Jernvall et Thesleff, 2000). Sa formation est régulée par des signaux venant du mésenchyme, en particulier BMP4 (Jernvall et coll., 1998). BMP4, BMPR-IA et BMPR-II sont impliqués dans la signalisation de l'apoptose au niveau des cellules internes du NEP à ED15 (Nadiri et coll., 2004). D'autre part, les cellules du NEP produisent des FGFs (D'Souza et coll., 1999), mais n'expriment pas leurs récepteurs, donc les cellules sont incapables de répondre aux stimuli mitogènes des FGFs. LEF-1 est fortement exprimé dans le NEP (Keranen et coll., 1998), et il est également co-localisé avec la beta-caténine dont le taux intranucléaire est plus élevé que dans n'importe quelle autre région de l'organe de l'émail. LEF-1 pourrait donc servir de médiateur nucléaire dans la voie de signalisation WNT canonique, interagir et moduler l'expression des gènes Wnt (Obara et Lesot, 2004). L'accumulation de la beta-caténine dans le noyau des cellules du NEP renforce ces données.

- **Stade de la cloche :**

C'est à ce stade que la morphogenèse coronaire s'achève et que les patrons cuspidiens spécifiques à chaque dent se mettent en place. Dans les dents pluricuspidées comme la première molaire inférieure, les nœuds de l'émail secondaires apparaissent au sommet de chaque cuspide. A ce stade une activité mitotique différentielle entre l'EDE et l'EDI est maintenue et les zones de la lèvre cervicale montrent des divisions intenses (Fig. 2). Dans le cas de l'incisive, il existe un gradient antéro-postérieur de l'activité mitotique, en effet la partie postérieure (formant la lèvre cervicale) possède l'index mitotique le plus élevé.

Toutes les cellules de l'organe de l'émail sont reliées entre elles par des espaces intercellulaires. Les cellules du centre de l'organe de l'émail prennent une forme étoilée et forment le réticulum étoilé (ou stellaire). Cette formation a été expliquée de la manière suivante : les cellules du centre de l'organe de l'émail sécrètent dans le compartiment extracellulaire une quantité importante de glycosaminoglycane, molécules hautement hydrophiles qui attirent l'eau à l'intérieur de l'organe de l'émail. L'eau augmente le volume des espaces intercellulaires, ce qui tend à éloigner les cellules les unes des autres. Comme celles-ci restent en contact par leurs jonctions desmosomiques, elles prennent une forme étoilée. L'ensemble de l'organe de l'émail est séparé des structures mésenchymateuses qui l'entourent (papille mésenchymateuse et sac folliculaire) par une membrane basale, les cellules de l'EDE et l'EDI sont en contact avec la membrane basale par des hémidesmosomes. Cette membrane basale contrôle les interactions épithélio-mésenchymateuses. La croissance de l'organe de l'émail s'effectue à partir de la zone de repli où l'EDE devient EDI : c'est la zone de réflexion.

## **b) Membrane basale**

Une membrane basale sépare l'épithélium du mésenchyme. Elle assure la jonction épithélio-mésenchymateuse et contrôle les échanges intertissulaires. Elle reste présente à l'interface des deux tissus pendant toute l'histogenèse dentaire. Les cellules épithéliales

s'appuient sur la membrane basale par des hémidesmosomes. La membrane basale proprement dite est constituée de :

- la lamina lucida sous-jacente aux cellules épithéliales, d'une épaisseur de 20 à 40 nm,
- la lamina densa d'aspect granulo-fibrillaire, d'une épaisseur de 30 à 50 nm.

Immédiatement sous la lamina densa se trouve une zone fibrillaire où s'ancrent les fibrilles de collagène du mésenchyme sous-jacent. La membrane basale est composée de : collagène de type IV organisé en réseau tridimensionnel, de glycoprotéines (laminine, fibronectine) (Lesot et coll., 1981), de protéoglycannes comprenant notamment des chondroïtines 4 et 6 sulfates et de l'héparane sulfate (Thesleff et coll., 1981). La membrane basale est élaborée à la fois par les cellules épithéliales (collagène de type IV, laminine, fibronectine) et les cellules mésenchymateuses (collagène, fibronectine).

### **c) Différenciation terminale des odontoblastes et des améloblastes**

La différenciation terminale des odontoblastes et des améloblastes intervient dans chaque dent selon un patron spatio-temporel spécifique (Lisi et coll., 2003), elle débute au sommet des cuspides et progresse en direction apicale formant un gradient de différenciation (Fig. 2). La taille et la morphologie coronaire d'un type de dent est fonction du nombre d'odontoblastes et d'améloblastes post-mitotiques ainsi que de leur distribution spatiale.

Dans la première molaire inférieure de souris, les premiers odontoblastes fonctionnels apparaissent au sommet des cuspides principales au 18<sup>ème</sup> jour de développement embryonnaire. Ce sont des cellules post-mitotiques qui au contact de la membrane basale s'allongent et se polarisent (Ruch, 1985). Le contrôle de ces cellules implique leur sortie du cycle cellulaire et leur polarisation qui est cytosquelette dépendante (Lesot et coll., 1992), faisant intervenir des interactions matrice-membrane-cytosquelette et les microtubules qui jouent aussi un rôle dans la différenciation fonctionnelle (sécrétion de la prédentine et de la dentine) (Lesot et coll., 1988, 1990). Dans un premier temps, les odontoblastes synthétisent et sécrètent les constituants organiques de la matrice extracellulaire de prédentine tels que la sialoprotéine dentaire, la phosphoprotéine dentaire, des collagènes (essentiellement trimère de

type I), des protéoglycanes, diverses métalloprotéinases et protéines sériques, divers lipides et facteurs de croissance membres de la famille des TGF-beta (Cam et coll., 1990 ; Linde et Goldberg, 1993). La prédentine qui est alors un tissu non minéralisé se transforme progressivement en dentine minéralisée.

Lors de l'histogenèse de l'organe de l'émail, l'EDI se différencie en préaméloblastes qui au contact de la prédentine/dentine débutent leur différenciation terminale (Karcher-Djuricic et coll., 1985). Ils sortent du cycle cellulaire, se polarisent, s'allongent et sécrètent les composants de l'émail (émailine, amélogénine, améloblastine, tufteline...) et les enzymes impliqués dans l'amélogénèse (Robinson et coll., 1995). Les améloblastes fonctionnels n'existent que dans les couronnes des germes dentaires (Fig. 2). Ce sont des cellules uniques responsables de la synthèse des constituants organiques de l'émail des dents. La différenciation terminale des améloblastes est initiée aux sommets des cuspidés, se propage en direction apicale, s'accompagne de la dégradation de la membrane basale et implique leur sortie du cycle cellulaire, leur allongement et leur polarisation sont cytosquelette-dépendante (Smith et Nanci, 1995). Les premiers améloblastes post-mitotiques sont observés environ 24 heures après l'apparition des premiers odontoblastes fonctionnels. Les améloblastes présécrétoires se transforment en améloblastes sécrétoires. Dans les conditions physiologiques, le dépôt d'émail n'est initié qu'en présence de dentine minéralisée. Les améloblastes forment un complexe fonctionnel avec le SI pour la sécrétion de l'émail (pour revue voir Lesot et Brook, 2008).

#### **d) Le sac folliculaire**

Le sac folliculaire ou sac dentaire enveloppe l'organe de l'émail et la papille mésenchymateuse. Dans un premier temps le sac folliculaire va avoir pour rôle 1) de protéger le germe dentaire au cours des étapes ultérieures de son développement 2) d'assurer à l'organe de l'émail les éléments nutritionnels nécessaires au cours de l'amélogénèse par l'intermédiaire de sa vascularisation. Ultérieurement, au cours de l'édification des racines, c'est au sein du sac folliculaire que se produiront à partir des éléments cellulaires d'une part à partir des éléments fibrillaires d'autre part, les processus de cytodifférenciation. Puis



histodifférenciation qui aboutira à la mise en place des tissus parodontaux ou tissus de soutien de la dent : os alvéolaire, ligaments et ciment. Le sac folliculaire est également important pour l'éruption dentaire.

#### **e) Email : composition et structure**

L'émail est le seul tissu minéralisé d'origine épithéliale, ce sont les améloblastes qui sont responsables de la sécrétion de sa matrice organique. A la fin de l'amélogénèse, les améloblastes perdent leur activité sécrétoire et leur prolongement, et déposent une dernière couche d'émail (la couche aprismatique), ensuite ils disparaissent après l'éruption dentaire (Bartlett et coll., 2006). L'émail recouvre la totalité de la couronne et ne se renouvelle plus après la formation de cette dernière. Pour compenser cette limitation, l'émail a acquis une organisation structurale complexe et un haut degré de minéralisation, rendu possible par l'absence quasi-totale de matrice organique dans son état mature. L'émail est formé par des cristaux d'hydroxyapatite, compact en forme de lambeau. L'unité calcium phosphate a une forme hexagonale. Ces cristaux sont groupés sous forme de « rods » (prismes) et « interrods » (substance interprismatique) d'émail (Arends et Jongebloed, 1979). Les prismes ont un trajet sinueux dans les 2/3 internes de l'émail. Dans le 1/3 externe, ils sont rectilignes, parallèles et perpendiculaires à la surface de la dent. Au microscope, on note des striations périodiques des prismes, témoins de la rythmicité de l'amélogénèse et des lignes de croissance (stries de Retzius, ligne néo-natale, périkymaties).

##### **o Caractéristiques physico-chimiques de l'émail**

L'émail mature est la matrice extra-cellulaire la plus minéralisée du corps avec 96% de matière minérale : l'hydroxyapatite  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$  (complexe calcium phosphate), substitué par des ions carbonates ( $\text{CO}_3^{2-}$ ), 4% de matière organique et de l'eau. La majeure partie de la matrice organique de l'émail est dégradée et réabsorbée par les améloblastes au stade de maturation (Fincham et coll., 1999). D'autres ions (Strontium, Magnésium, Plomb, Fluoride), sont capables de s'incorporer dans les cristaux d'émail, s'ils sont présents pendant sa formation.

Grâce à sa haute minéralisation, l'émail est très dur, ce qui lui permet de supporter les forces mécaniques appliquées pendant le fonctionnement des dents. Mais cette grande minéralisation rend aussi l'émail très cassant. C'est pourquoi, il doit être soutenu par une sous-couche de dentine, plus «souple». Si ce support est détruit, l'émail qui ne sera plus soutenu, se cassera facilement.

La formation de l'émail n'implique pas une étape de pré-émail non minéralisé (comme la pré-dentine), les cristaux d'émail grandissent directement contre la surface de sécrétion des améloblastes. Bien que la matrice formée par les amélogénines solubles puisse constituer un support physique, les protéines de l'émail ne jouent pas un rôle de structure, comme le ferait le collagène dans les os, la dentine et le ciment. Donc, l'organisation 3D présente dans l'émail résulte de l'arrangement des cristaux. Les protéines non-amélogénines induisent et guident la formation des cristaux d'émail, alors que les amélogénines régulent la croissance en épaisseur et la largeur des cristaux. Les amélogénines empêchent également la fusion des cristaux pendant leur formation et sont dégradées pendant la maturation de l'émail (Robinson et coll., 1998).

#### ○ **Minéralisation de l'émail**

L'émail est d'abord formé au niveau des cuspides, sa minéralisation nécessite un large influx de minéraux. Le transfert du calcium depuis le sang jusque dans l'émail implique des voies inter- et trans-cellulaire. Le calcium est acheminé à travers les améloblastes dans des stocks de haute capacité, associés au réticulum endoplasmique ce qui empêche l'effet cytotoxique du calcium dans le cytoplasme cellulaire (Robinson et coll., 1979). Aucune vésicule n'est associée à la minéralisation de l'émail, comme c'est le cas pour les tissus calcifiés à l'aide du collagène. Le degré de minéralisation de l'émail diminue de la surface externe de la couronne dentaire et en direction de la jonction émail-dentine (JED). Cette JED est établie dès que ces deux tissus commencent à se former. Avant que l'émail ne se forme, quelques processus odontoblastiques s'étendent jusque dans la couche des améloblastes, et, une fois que l'émail a commencé à se former, ces processus se retrouvent emprisonnés (tiges

d'émail). La JED est constituée de plusieurs séries de crêtes (ridges), ce qui augmente probablement l'adhésion entre la dentine et l'émail (Kerebel et coll., 1979). Ces crêtes sont plus prononcées dans la région coronale de la dentine où le stress mécanique occlusal est le plus élevé. La forme et la nature de la jonction empêchent les fractures de l'émail pendant la fonction dentaire.

## **f) Complexe pulpo-dentinaire**

### **o La pulpe**

La pulpe dentaire est la forme mature de la papille mésenchymateuse. C'est un tissu conjonctif lâche qui occupe la partie centrale de la dent. L'espace occupé s'appelle la cavité pulpaire. Elle est divisée en 2 régions : la portion coronale (chambre pulpaire coronaire) et la portion canalaire (la pulpe radiculaire). La chambre pulpaire reproduit la forme de la couronne, sous les cuspidés, la chambre s'étend sous forme de cornes. Les canaux de la racine se terminent dans le foramen apical, où la pulpe et le ligament parodontal se rencontrent et où les principaux nerfs et vaisseaux entrent et sortent de la dent (Takuma et Nagai., 1971).

La pulpe est richement innervée et vascularisée, elle assure pour la totalité de l'organe dentaire les fonctions de sensibilité, nutrition, défense et cicatrisation. Les principales cellules de la pulpe sont :

- les odontoblastes qui élaborent les composants matriciels de la dentine,
- les cellules de relais situées dans la zone sous odontoblastique, et ayant une activité dentinogénétique en condition réactionnelle ;
- les autres groupes cellulaires : les fibrocytes, les cellules mésenchymateuses indifférenciées, les histiocytes, les macrophages, les lymphocytes T, les cellules dendritiques, etc. (Jontell et coll., 1998) et plus récemment des cellules progénitrices, appelées Dental Pulp Stem cells (DPSC) ont été décrites par Gronthos et coll., (2000).

- **Composition, formation et structure de la dentine**

La dentine est la portion dure du complexe pulpo-dentinaire, elle est plus dure que l'os et plus souple que l'émail. C'est une matrice traversée par plusieurs tubuli contenant des prolongements cytoplasmiques provenant des odontoblastes. Les corps cellulaires des odontoblastes sont alignés contre la couche de prédentine, où ils forment la limite avec le reste de la pulpe (Sigal et coll., 1984).

La dentine est d'abord déposée comme une couche de matrice non minéralisée, appelée prédentine qui borde la pulpe (portion la plus interne). La prédentine est constituée de composants collagéniques et non collagéniques. Elle se minéralise progressivement pour se transformer en dentine. La dentine mature est composée de 70% de matière inorganique (hydroxyapatite), de 20% de matière organique (30% de collagène de type I, III et V avec des inclusions de lipides et de protéines de la matrice non collagénique) et de 10% d'eau (Goldberg et Septier, 1996).

- **Types de dentine**

Dentine primaire : est formée pendant le développement de la couronne dentaire et limite les contours de la chambre pulpaire. La couche la plus externe s'appelle la « mantle dentin » (dentine primordiale), elle est formée par les premiers odontoblastes différenciés qui n'ont pas encore développé leurs processus odontoblastiques. La dentine primordiale est une fine couche, située au niveau de la JED, elle ne contient pas ou peu de tubuli. On y trouve des terminaisons nerveuses. Cette couche contient des fibres de collagène essentiellement de type-1. La minéralisation de cette couche est quasi instantanée et moins minéralisée (-4%) que le reste de la dentine circumpulpaire. La dentine primaire est déposée par des odontoblastes totalement différenciés et matures, qui sécrètent une matrice plus riche en lipides, phospholipides et phosphorines (Linde et Goldberg, 1993). De plus, à cette étape, les capillaires migrent entre les odontoblastes permettant ainsi d'augmenter les échanges. A la fin de la dentinogenèse, les capillaires se retirent.

Dentine secondaire : est formée après que la rhizogénèse soit terminée. Elle est moins minéralisée que la dentine primaire. Elle est également déposée par les odontoblastes, mais de manière lente et continue. Cette dentine a une structure tubulaire en continuité avec celle de la dentine primaire. La dentine secondaire n'est pas déposée de la même manière tout autour de la chambre pulpaire. La plus grande déposition de dentine secondaire se fait au niveau du plancher de la chambre pulpaire, ce qui amène à une réduction asymétrique de la taille et la forme de la pulpe. Les tubuli de la dentine secondaire se sclérosent avec le temps, plus facilement que les tubuli de la dentine primaire. Ce processus tend à réduire la perméabilité de la dentine, ce qui protège la pulpe (Linde et Goldberg, 1993).

Dentine tertiaire (dentine réactionnelle) : est produite en réponse à divers stimuli, comme l'attrition, les caries etc. La dentine tertiaire est produite seulement par les cellules directement atteintes par les stimuli. La qualité et la quantité de cette dentine est en relation avec la réponse cellulaire initiée par les stimuli, qui dépend de la durée et de l'intensité de ces derniers. La dentine tertiaire peut avoir des tubuli en continuité avec ceux de la dentine secondaire, mais sont mal organisés, et non fonctionnels. Cette dentine est déposée beaucoup plus rapidement que les autres dentines. Elle est très minéralisée (Magloire et coll., 2001).

### **g) Formation de la racine**

Une fois la gaine d'Hertwig formée, elle initie rapidement la rhizogénèse. Une membrane basale (MB) sépare la gaine d'Hertwig des mésenchymes pulpaire et folliculaire :

- Du côté pulpaire, la MB est similaire à celle de la couronne, elle contient des fibrilles d'ancrage riches en fibronectine. Les cellules de l'épithélium interne entourent de plus en plus la pulpe et initient la différenciation des odontoblastes qui sécrètent la dentine radiculaire.
- Du côté folliculaire, la MB ne porte pas de fibrilles d'ancrage.

Au fur et à mesure de la progression de la formation de la dentine radiculaire, la gaine épithéliale de Hertwig se désagrège permettant le contact direct de la dentine avec le

mésenchyme folliculaire, qui initie la différenciation des cémentoblastes (Diekwisch, 2001; Bosshardt, 2005).

Le sac folliculaire est constitué de trois groupes cellulaires superposés:

- Les cellules de la couche interne: se différencient en cémentoblastes et forment le ciment.
- Les cellules de la couche intermédiaire: forment les fibres parodontales.
- Les cellules de la couche externe: forment de l'os alvéolaire.

#### ○ **Le Cément**

C'est un tissu dur avasculaire qui recouvre la dentine radiculaire. Il existe deux formes de ciments qui ont des caractéristiques structurales et fonctionnelles différentes. Le ciment acellulaire, qui attache le ligament parodontal à la racine dentaire et le ciment cellulaire qui a un rôle d'adaptation en réponse aux mouvements et à l'usure de la dent (Diekwisch, 2001).

Le ciment se classifie en fonction de trois facteurs:

- le temps de formation (primaire ou secondaire)
- la présence ou l'absence de cellules (acellulaire ou cellulaire)
- l'origine des fibres de collagène de la matrice: les fibres intrinsèques résultent des cémentoblastes, alors que les extrinsèques résultent de l'incorporation des fibres du ligament parodontal sécrété par les fibroblastes.

Selon ces critères on distingue cinq types de ciments :

- primaire acellulaire de fibres intrinsèques
- primaire acellulaire de fibres extrinsèques
- secondaire cellulaire de fibres intrinsèques
- secondaire cellulaire de fibres mixtes
- acellulaire et afibrillaire.

## **h) L'éruption dentaire**

Les mouvements éruptifs de la dent commencent avec le début de la formation des racines. L'émail reste couvert par une couche d'améloblastes et des restes des autres groupes cellulaires de l'organe d'émail. Ensemble, les améloblastes et les autres cellules forment le « reduced enamel epithelium » (couche réduite de l'émail). Ce dernier fusionne avec l'épithélium oral, et forme une masse solide de cellules épithéliales autour de la couronne dentaire. Les cellules centrales à l'intérieur de cette masse se dégradent, formant un canal épithélial à travers lequel la couronne dentaire fait son éruption.

### **o Mécanismes d'éruption de la dent**

L'éruption dentaire est un phénomène complexe non systémique, qui se déroule sur plusieurs phases (Marks et Schroeder, 1996):

- Prééruptif : impliquant la croissance folliculaire et la migration intra-osseuse ;
- Eruptif : d'abord intra-osseuse, ensuite extra-osseuse et jusqu'au contact occlusal ;
- Postéruptif : correspondant aux mouvements d'adaptation à l'occlusion et à l'usure d'émail.

Plusieurs hypothèses ont été émises au sujet des éléments responsables de l'éruption dentaire :

- la formation de la racine : la racine croissante pousse la dent,
- la pression hydrostatique artérielle : permet de pousser la dent en éruption par le gonflement de la substance de base,
- le remodelage osseux : fait bouger la dent par apposition résorption.

Les études de Marks et Cahill (1984) et de Larson et coll. (1994), réalisées chez les chiens Beagle ont montré que seules les germes dentaires avec le follicule font éruption, et ont conclu que c'est le follicule qui initie l'éruption dentaire.

## II.4. Vascularisation

### a) Mise en place du réseau vasculaire

Les vaisseaux sanguins peuvent se développer suivant deux mécanismes distincts : la vasculogénèse et l'angiogénèse. La vasculogénèse correspond à la formation des vaisseaux à partir de cellules souches (hémangioblastes et angioblastes), capables de se différencier en cellules endothéliales. Ces cellules vont acquérir les caractéristiques morphologiques et fonctionnelles nécessaires pour former un premier réseau vasculaire (Carmeliet, 2003, 2005). À partir de ce réseau vasculaire commence la croissance des vaisseaux et capillaires collatéraux qui se dirigent vers les tissus et les organes, c'est ce que l'on appelle l'angiogénèse (Carmeliet, 2003, 2005). Les cellules endothéliales vasculaires pourraient avoir d'autres rôles que celui de constituer des parois de vaisseaux sanguins. Ainsi elles peuvent favoriser le développement des cellules souches par le biais des signaux paracrines (Coultas, 2005).

Le réseau vasculaire n'existe pas chez l'embryon. Il se met en place très progressivement. Cela nécessite l'intervention coordonnée de multiples facteurs, certains activateurs, d'autres inhibiteurs, qui interviennent dans les différentes étapes aboutissant à la formation d'un nouveau vaisseau. Le premier activateur identifié fut le fibroblast growth-factor (FGF) notamment FGF-2 (Shing et coll.; 1984). De nombreuses molécules ont depuis été identifiées, constituant un ensemble très hétérogène de par leur nature, leur mécanisme d'activation et leur fonction. Cet ensemble comprend essentiellement des facteurs de croissance tels que : TGF-alpha, TGF-beta, EGF, PDECGF, VEGF etc.... Parmi ces molécules, les VEGFs (vascular endothelium growth factors), constituent les principaux facteurs de croissance vasculaire, essentiels au développement embryonnaire puisque l'expression d'un seul des deux allèles n'est pas suffisante pour permettre le développement du réseau vasculaire, le VEGF agit à tous les stades de l'angiogénèse: il augmente la perméabilité vasculaire, favorise la prolifération et la migration des cellules endothéliales et mobilise les angioblastes. C'est enfin un agent chimiotactique pour les monocytes et les cellules musculaires lisses vasculaires. L'expression du VEGF est réglée par plusieurs cytokines et facteurs de croissance (TGF transforming growth factor, IL-1 interleukine, FGF fibroblast growth factor, PDGF platelet-derived growth factor, IGF insulin-like growth factor-



1...) et par les facteurs sensibles à l'hypoxie. Le VEGF comporte cinq homologues, le VEGF-A dont quatre isoformes sont décrites et les VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E (Dvorak; 2002). Il se fixe sur trois récepteurs différents, VEGF-R1 (flt-1), VEGF-R2 (FLK-1/KDR) et VEGFR3 qui sont situés à la surface de l'endothélium vasculaire. Chacun de ces homologues comme les récepteurs ont des localisations et des sites d'action différents, le VEGF-R3 étant situé uniquement au niveau des vaisseaux lymphatiques. Ces récepteurs sont pourvus d'une activité tyrosine kinase qui, une fois activée, déclenche une cascade de réactions intracellulaires. Les autres facteurs activateurs (FGF, angiopoïétine, etc.) agissent également par des récepteurs qui leur sont propres.

Cette liste de molécules ne cesse de croître à mesure que notre compréhension des mécanismes de la néo-vascularisation s'élargit et d'autres agents devraient s'y ajouter comme Notch, la famille des éphrines etc. Des molécules inhibitrices de la néo-vascularisation ont également été identifiées.

Ces molécules jouent des rôles complémentaires, s'effectuant à différentes étapes de la formation des vaisseaux. Elles interviennent dans la multiplication des cellules endothéliales, leur migration, leur perméabilité ou encore leur différenciation. De même leur inhibition intervient en régulant l'apoptose des cellules endothéliales (angiostatine), mais aussi leur migration (angiomotine), leur prolifération (endostatine) et leur différenciation.

La formation de nouveaux vaisseaux s'accomplit en différentes étapes après son activation : en réponse au stimulus, les cellules endothéliales prolifèrent et migrent vers la zone du stimulus, s'organisent en un tube qui va s'unir à un autre vaisseau pour constituer une boucle qui sera finalement recouverte par une membrane basale puis des péricytes. Les mécanismes moléculaires associés à ces différentes étapes sont progressivement identifiés : ils nécessitent l'activation successive d'un grand nombre de molécules en association avec les substances angiogéniques qui influent sur une ou plusieurs de ces étapes. Ainsi les VEGFs initient la multiplication et la migration des cellules endothéliales, alors que d'autres facteurs permettent la maturation des vaisseaux, leur stabilisation et le remodelage vasculaire, comme

l'angiopoïétine 1 (Ang1) ou le PDGF qui induit le recouvrement des vaisseaux par des péricytes. L'activation des cellules endothéliales s'accompagne de l'expression à leur surface de récepteurs pour des facteurs de croissance (VEGFs) et de molécules d'adhésion comme les PECAM (CD31). Cette activation leur confère une plus grande résistance aux différents stimuli et agressions auxquelles elles sont confrontées.

La papille dentaire est précocement vascularisée dès le stade de la cloche, par des vaisseaux qui pénètrent à la base de la papille et qui se ramifient au sein du mésenchyme. On distingue les troncs principaux, au centre de la papille, parallèles au futur grand axe de la dent. Un réseau vasculaire dense occupe tout le mésenchyme papillaire. Des anses capillaires terminales aboutissent à la périphérie de la papille mésenchymateuse. Progressivement, on y observe, la formation de deux zones distinctes, une zone centrale analogue à l'ensemble papillaire observée dans les stades les plus précoces et une zone périphérique sous-jacente à l'EDI dont elle est séparée par la membrane basale. Cette zone périphérique est caractérisée par une plus grande concentration cellulaire, sans pour autant que l'on puisse mettre en évidence aucun processus de cytodifférenciation à ce stade, un développement de la vascularisation et la présence d'anses capillaires terminales, un épaissement des structures fibrillaires. C'est au niveau de la zone périphérique qu'apparaîtront ultérieurement les étapes successives de l'élaboration de la dentine. La dentinogenèse débutera au sommet de la papille et se poursuivra progressivement dans les zones latérales. La zone centrale conservera son aspect structural de tissu conjonctif à prédominance cellulaire et formera la pulpe.

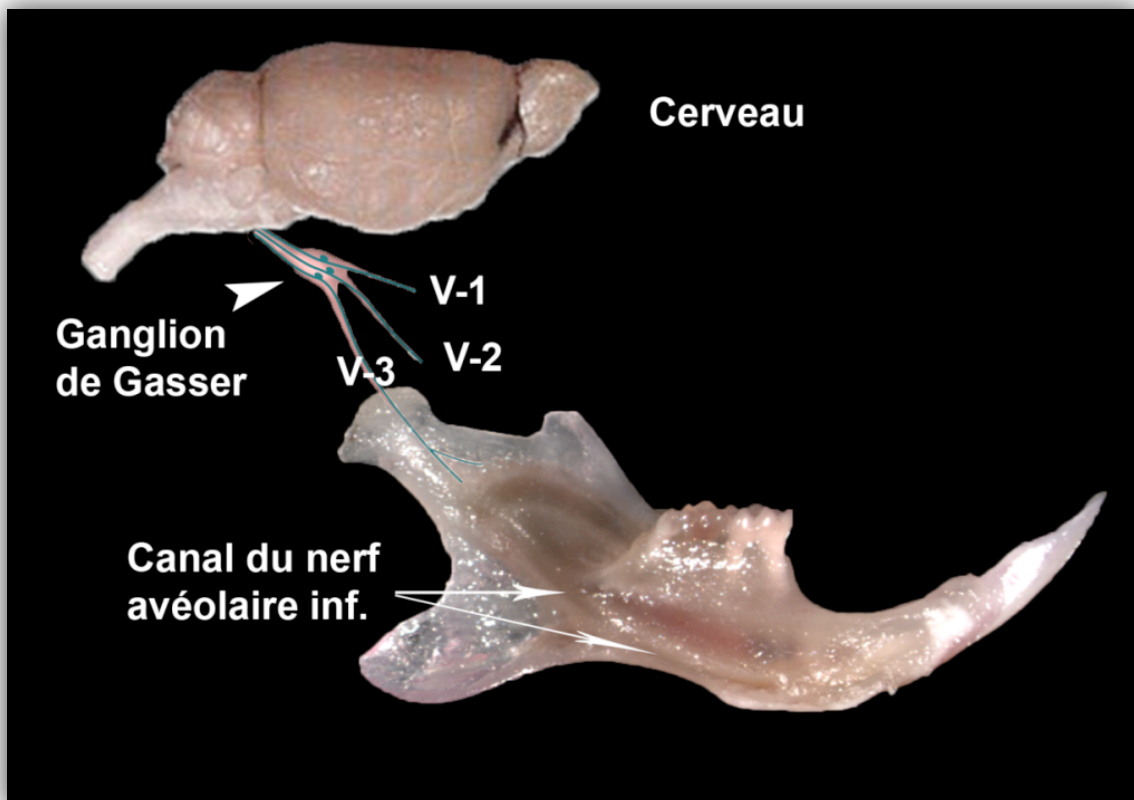
## **II.5. Innervation**

### **a) Anatomo-physiologie de l'innervation dentaire**

Chez l'embryon de souris, deux à trois jours avant les premières manifestations morphologiques du développement dentaire apparaissent (E11), le système trigéminal commence. Des axones sensitifs du ganglion trigéminal et axones sympathiques du ganglion cervical supérieur ont été localisés au niveau des futurs emplacements dentaires au 10<sup>ème</sup> jour embryonnaire (Lumsden et Davies, 1983).

## b) Le système trigéminal chez la souris

Le système trigéminal chez la souris est constitué du ganglion trigéminal, d'axones, et leurs tissus périphériques de cible. L'organe dentaire constitue une des cibles principales pour l'innervation sensorielle des branches du nerf trijumeau (V), V-2 pour le maxillaire et V-3 pour la mandibule (Fig. 3).

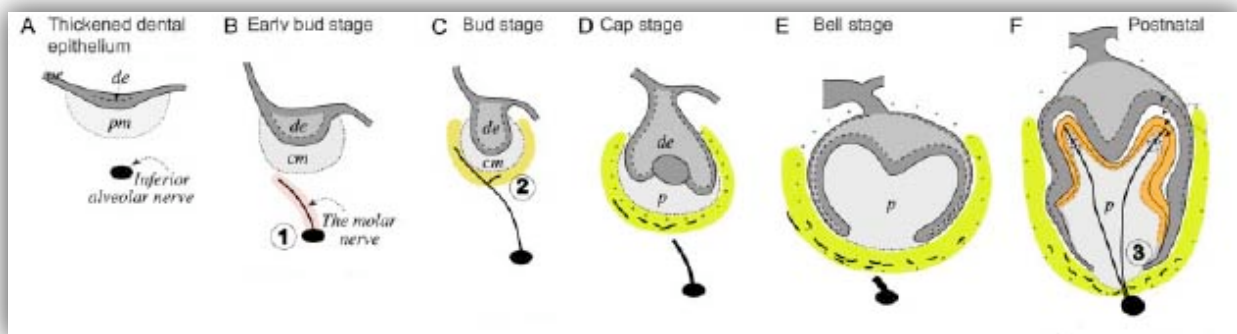


**Figure 3** Anatomie simplifiée du nerf trijumeau (V): le nerf ophtalmique de Willis (V-1), le nerf maxillaire (V-2) et le nerf mandibulaire (V-3)

L'origine du nerf trijumeau est constituée par 4 noyaux situés dans le tronc cérébral : un noyau moteur et trois noyaux sensitifs (mésencéphalique, spinal, principal). Le nerf émerge du tronc cérébral au niveau de la protubérance à la jonction de la face antérieure de celle-ci avec le pédoncule cérébelleux moyen, à l'union du tiers supérieur et des deux tiers inférieurs du pont. Le trijumeau est le nerf crânien le plus volumineux. Il quitte le tronc

cérébral par deux racines distinctes: une racine sensitive large et une racine motrice beaucoup plus grêle. Les deux racines sont engainées par un feuillet pie-mérien propre. La racine sensitive, arrondie à l'origine, s'aplatit et s'élargit pour former le ganglion de Gasser qui se divise en trois branches principales sensibles : V-1 le nerf ophtalmique, V-2 le nerf maxillaire et V-3 le nerf mandibulaire.

Les premières molaires utilisées dans notre étude sont innervées par le nerf alvéolaire qui est une branche du nerf mandibulaire V-3 (Fig. 3).



**Figure 4 :** Développement de l'innervation au cours du développement de la première molaire chez la souris d'après Luukko et coll., (2005).

Au cours de l'odontogenèse, des fibres sensibles du nerf trijumeau ont été détectées à proximité du mésenchyme du germe dentaire vers le 12<sup>ème</sup>-13<sup>ème</sup> jour de gestation (Loes et coll., 2002). A partir du 14<sup>ème</sup> jour, elles ont été observées au niveau de sac folliculaire, peu après le début de la minéralisation des tissus dentaires au 2<sup>ème</sup> – 3<sup>ème</sup> jour après la naissance, les fibres nerveuses pénètrent dans la papille dentaire et dans la couche d'odontoblastes (Fig. 4) (Luukko, 1997; Luukko et coll., 2005).

### c) Contrôle de l'innervation

#### o Croissance axonale

Sur le plan moléculaire, la croissance axonale nécessite la présence de signaux dont l'action coordonnée oriente le trajet des neurites. Ces signaux entraînent une attraction ou une répulsion des neurites et sont fournis par des molécules sécrétées dans l'environnement du neurone et diffusant sur de plus ou moins longues distances. Plusieurs facteurs neurotrophiques, tels que NGF (nerve growth factor) et Gdnf (glial cell line-derived neurotrophic factor), interviennent dans l'innervation de la dent. Le facteur de croissance nerveux NGF est un des premiers facteurs de croissance diffusible ayant une activité neurotrophique qui a pu être identifié : NGF permet en effet la survie et la croissance de certains groupes de neurones, *in vivo* aussi bien qu'*in vitro* (Pan et coll., 2000). Les neurotrophines se fixent sur une famille de récepteurs membranaires de haute affinité à activité tyrosine kinase, les Trk (tyrosine kinase receptor). Chaque neurotrophine se fixe préférentiellement sur un Trk différent (NGF par exemple se fixe préférentiellement sur TrkA). Le second type de récepteur auquel se fixent indifféremment toutes les neurotrophines est la glycoprotéine transmembranaire p75 qui appartient à la superfamille des récepteurs des facteurs de nécrose tumoraux (TNF-R).

En plus de leur rôle dans la mise en place de l'innervation, il semblerait que NGF et p75 interviennent également dans la morphogenèse de l'organe dentaire. En effet la localisation simultanée de NGF et de p75 dans le mésenchyme dentaire correspond aux zones de différenciation odontoblastique (Mitsiadis et coll., 1995).

#### o Guidage axonal

Une autre famille de molécules indispensables à la mise en place du système nerveux, sont les Sémaphorines. Il existe 8 classes de Sémaphorines. Les classes 3, 4, 6, 7 concernent les vertébrés, et la classe 5 se retrouve aussi bien chez les vertébrés que les invertébrés. On peut mettre en parallèle certaines classes, les Sémaphorines des classes 1 et 6 se lient toutes les deux à la membrane ; de même les Sémaphorines des classes 2 et 3 sont des protéines

sécrétées, spécifiques à un phylum (vertébrés/invertébrés). La plupart des Sémaphorines ont comme récepteur les plexines. La Sémaphorine 3A interagit avec les neuropilines et notamment la neuropiline 1 et les Sémaphorines de la classe 7, avec les intégrines (Elhabazi et coll., 2003; Kumanogoh et Kikutani, 2010).

Les Sémaphorines jouent un rôle majeur dans la formation du réseau neuronal et, depuis peu, leur implication a été montrée dans la migration cellulaire, dans l'angiogénèse, dans l'oncogénèse et aussi dans la réponse immunitaire (Zhou et coll., 2008). Les Sémaphorines sont des protéines membranaires caractérisées par leurs propriétés répulsives sur le guidage axonal. Il est apparu que des Sémaphorines pouvaient aussi exercer un effet attractif sur les axones conférant à ces molécules une place importante dans la régulation de la migration des cellules nerveuses. Les Sémaphorines les plus intéressantes pour l'odontogénèse sont la semaphorine 3A (SEMA 3A) qui repousse les axones et inversement la SEMA 7A qui les attire (Luukko et coll., 1997).

## **III.MATERIEL ET METHODES**

### **a) Matériel**

Nous utilisons les souris de la souche CD-1 car le développement dentaire est largement documenté et considérons comme jour 0 de la gestation, le jour de mise en évidence du bouchon vaginal. Les souris gestantes sont sacrifiées conformément aux recommandations de la Communauté Economique Européenne (86/609-CEE).

### **b) Prélèvement des germes dentaires**

Les embryons de souris sont prélevés sur des femelles sacrifiées au 14<sup>ème</sup> jour de gestation. La manipulation des embryons (Fig. 5 A) et la dissection des germes des premières molaires inférieures sont réalisées à l'aide d'un stéréomicroscope (Leica MZ 9,5) :

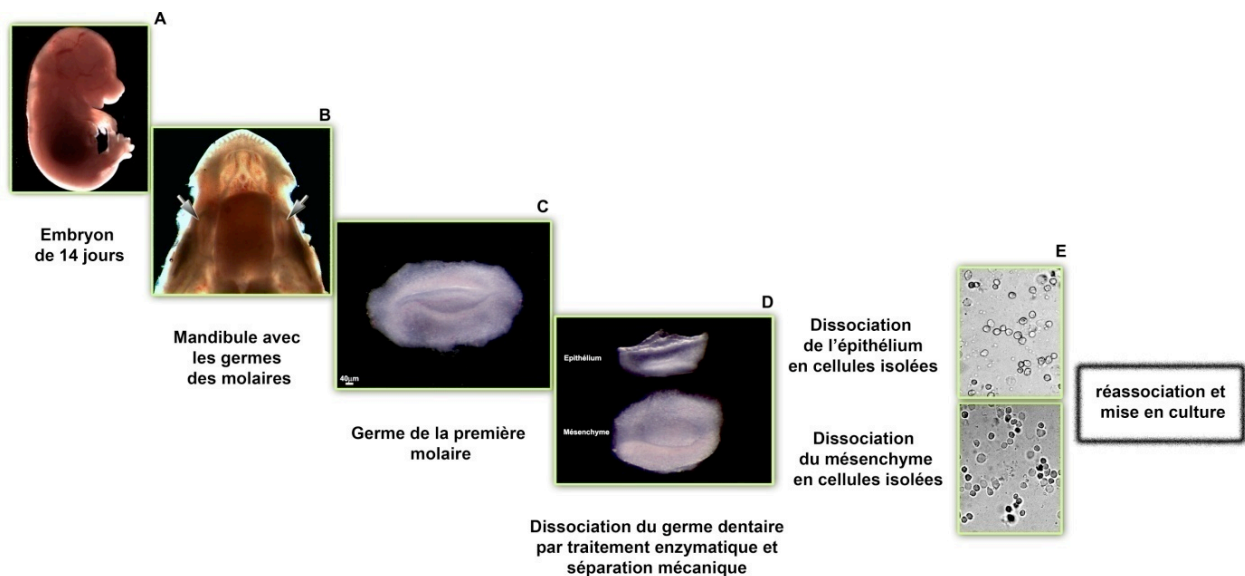
- Isoler l'arcade mandibulaire (Fig. 5 B);
- Localiser les germes de la première molaire (Fig. F B flèches);
- Séparer le germe des tissus environnants (Fig. 5 C).

### **c) Dissociations tissulaires**

Après prélèvement des ébauches de premières molaires inférieures sur les embryons du jour 14, les épithéliums et mésenchymes dentaires sont dissociés (Fig. 5 D) mécaniquement après un traitement enzymatique à la trypsine (Difco) à 1% dans du Hank's à 4°C pendant 30 min, l'action de la trypsine est arrêtée par plusieurs rinçages successifs avec du milieu de culture. La contamination d'un tissu par l'autre est évitée. Après séparation de ces deux tissus, le tissu épithélial est dissocié en cellules épithéliales (Fig. 5 E) et le tissu mésenchymateux est dissocié en cellules mésenchymateuses (Fig. 5 E). La séparation des cellules se fait mécaniquement à l'aide d'un filtre de 70 µm. Les suspensions cellulaires sont conservées dans des tubes Eppendorf de 1,5 ml contenant 1ml de milieu de culture. Ensuite les deux types cellulaires sont centrifugés séparément à 9,000 g pendant 2 min. Des fragments



du culot épithélial sont ensuite réassociés avec des fragments du culot mésenchymateux et mis en culture. L'ensemble du protocole a été décrit précédemment par Hu et coll., (2005 b).



**Figure 5 :** Prélèvement et dissociations tissulaires des germes de la première molaire inférieure

#### **d) Cultures *in vitro***

Les cultures des germes de premières molaires ou de réassociations entre cellules épithéliales et mésenchymateuses ont été maintenues sur un milieu semi-solide à 37°C dans une étuve à CO<sub>2</sub> (5%) en atmosphère humide. Le milieu, DMEM/F-12 (Gibco), est supplémenté en acide ascorbique (0,18 mg/ml, Merck), L-Glutamine (2mM, Gibco), pénicilline/streptomycine (50 unités/ml, Gibco), sérum de veau fœtal (20%) et solidifié par de l'agar (0,36%, Sigma). Le milieu de culture est changé tous les deux jours.

### **e) Implantation**

Après 6 et 8 jours de culture *in vitro*, les échantillons ont été implantés en sous-cutané dans une zone située derrière l'oreille ou dans le diastème mandibulaire chez les souris CD-1 âgées de 18 à 20 semaines. Les implants ont été maintenus *in vivo* de 2 jours à 4 semaines.

L'intervention dure environ 30 min. L'anesthésie est réalisée par voie intrapéritonéale avec du Pentobarbital sodique (0,5 ml/kg). La zone d'implantation est nettoyée avec de l'alcool (1 cm plus étendue que le site d'implantation). Une incision superficielle d'environ 0,2 - 0,3 cm de longueur est réalisée à l'aide d'un bistouri. 2 à 5 germes dentaires issus de culture de molaires intactes ou de réassociations sont implantés en sous-cutané derrière chaque oreille. D'autre part, pour les implantations dans la mandibule un germe ou une réassociation est implanté au niveau du diastème après réalisation d'un forage d'environ 1,5 mm de diamètre et de profondeur. Les sites d'implantations sont suturés avec du fil chirurgical résorbable (vicryl rapide). Les souris sont surveillées chaque jour. Les souris sont sacrifiées avant de prélever les implants.

### **f) Immunofluorescence**

Les coupes examinées proviennent de situations différentes : a) *Ex vivo* : des têtes d'embryons et de souris sont prélevées aux différents âges, congelées dans 2-méthyl butane préalablement refroidi dans de la carboglace et stockées à  $-30^{\circ}\text{C}$  b) Culture *in vitro* : les cultures pour les germes de molaires intactes et les réassociations, disposées dans un milieu d'inclusion (Tissu Tek) et stockées à  $-30^{\circ}\text{C}$ . c) Implantation *in vivo* : Les implants sont récupérés, inclus dans du Tissu tek, congelés et stockés à  $-30^{\circ}\text{C}$ . Tous les échantillons ont été débités en coupes de 7  $\mu\text{m}$ , qui sont récupérées sur des lames « Polylysine ». Ensuite, les coupes sont saturées dans 1% BSA/PBS pendant 20 min, puis, incubées avec les anticorps primaires spécifiques à température ambiante. Après 3 lavages de 5 min avec le PBS, les coupes sont incubées avec les anticorps secondaires correspondants, à température ambiante pendant 1h ou 2h. Enfin, après 3 lavages avec du PBS, les coupes sont montées avec du

milieu de montage Dakocytomation (Dako), recouvertes d'une lamelle et observées au microscope Leica (DM 4000B).

### **g) Histologie**

Les pièces sont fixées au Bouin-Hollande dont la composition est : 2,5 g d'acétone neutre de cuivre, 4 g d'acide picrique, 10 ml de formaldéhyde en solution réactif à 37% et 100 ml d'H<sub>2</sub>O distillée. Après 24h, la solution est filtrée et 1 ml d'acide acétique est ajouté. La durée de fixation peut varier entre 3h et 1 jour en fonction de la taille des échantillons. Les pièces sont ensuite incluses dans la paraffine, le but de l'inclusion est de faire pénétrer la paraffine à l'intérieur des échantillons fixés, puis d'inclure cette pièce dans un bloc de paraffine pour constituer une masse homogène facile à couper au microtome. La paraffine n'étant pas soluble dans l'eau, les échantillons doivent être préalablement déshydratés. Cette opération se fait en deux temps : l'alcool éthylique permet d'éliminer l'eau, puis, il est remplacé par des solvants de la paraffine. Plusieurs bains d'alcool éthylique sont utilisés : le premier bain à 70 % pendant 1 h, le second à 90 % pendant 1 h puis trois bains à 100 % pendant 30 min. L'imprégnation dans le LMR-SOL, contenant du trichloroéthane, se fait par trois bains successifs de 30 min. L'inclusion dans la paraffine est réalisée dans une étuve à 60°C avec trois premiers bains d'1 h, un troisième bain pendant la nuit et un dernier d'1h. Les échantillons sont débités en coupes sériées de 5µm. Les coupes sont déparaffinées par deux bains successifs de LMR-SOL de 5 min. Elles sont réhydratées progressivement par deux bains d'alcool à 100% de 5 min, un bain à 90% de 5 min, un bain à 70% de 5 min et un bain d'eau distillée de 30 s. Les lames sont colorées grâce à différents bains : 1 h dans une solution aqueuse saturée à 6% de chlorure mercurique, 30 s dans l'eau, 5 min dans le Lugol, 30 s dans l'eau, 5 min dans du thiosulfate de sodium à 5%, 5 min dans l'acide oxalique à 5%, 2 à 5 min dans l'eau et 24 h dans le colorant de Mallory.

Les observations et prises de vue ont été faites sur un microscope Leica (DM4000B), relié à un ordinateur PC par une caméra Leica DFC 300 FX.

## **IV. RESULTATS**

## IV.1. LA VASCULARISATION

Le système vasculaire joue un rôle important au cours de l'embryogenèse. Il est essentiel pour la croissance de tous les tissus et organes. Les vaisseaux sanguins assurent l'apport des nutriments dont l'oxygène et les échanges métaboliques nécessaires pour l'organogenèse (Thisse et Zon, 2002). La formation des vaisseaux nécessite l'intervention coordonnée de facteurs multiples. Cela comprend des molécules dont l'activité est essentiellement vasculaire comme l'angiogénine, l'angiotropine, le facteur de perméabilité vasculaire et surtout des facteurs de croissance (VEGF, FGFs, PDGF, etc.) ainsi que des molécules telles que les BMPs dont les effets sont beaucoup plus larges (Cebe-Suarez et coll., 2006).

Depuis les années 1950, de nombreux travaux ont été consacrés à l'étude de la vascularisation au cours de l'odontogenèse (Kindlova, 1970 ; Josephsen et coll., 1974 ; Nagai et Frank, 1974 ; Bonnaud, 1984 ; Takahashi, 1985 ; Yoshida et Ohshima, 1996 ; Kat et coll., 2003 ; Manzke et coll., 2005), à l'étude de la revascularisation des dents transplantées (Hammer, 1955 ; Hoffman, 1960 ; Johnson et Burich, 1979 ; Carlile, 1998) et enfin, à l'étude de la revascularisation des germes dentaires implantés après culture *in vitro* (Kollar et Baird, 1970a et b). La plupart des résultats obtenus proviennent d'observations histologiques, et de microscopie électronique à balayage et/ou à transmission. Au fur et à mesure du développement dentaire, un réseau capillaire se met en place, tout d'abord autour du mésenchyme dentaire (Lesot et Ruch, 1979) et ensuite dans le mésenchyme dentaire jusqu'à proximité de l'épithélium dentaire interne (Lesot et coll., 1981; Yoshida et coll., 1998). Plus tard, au cours de l'amélogénèse, ce réseau vasculaire envahit le réticulum stellaire (Scott et Symons, 1982; Ten Cate, 1998; Manzke et coll., 2005). Manzke et coll., (2005) suggèrent que le développement de la vascularisation de la dent, en particulier dans l'organe de l'email, inclut les deux mécanismes de formation des vaisseaux : la vasculogenèse et l'angiogenèse.

Bien que l'organisation tridimensionnelle des capillaires dentaires ait été précédemment étudiée (Tsuzuki et Sasa, 1994; Cerri et coll., 2004), la chronologie de sa mise en place n'est pas connue chez la souris qui est notre modèle d'étude.

En partant de réassociations entre cellules dentaires embryonnaires (épithéliales et mésenchymateuses), nous avons déterminé les conditions expérimentales permettant d'obtenir le développement coronaire, incluant la morphogenèse globale, l'histogenèse épithéliale et la différenciation d'odontoblastes et d'améloblastes. La formation des racines a été obtenue après implantation sous-cutanée chez la souris adulte de réassociations cultivées. Dans ces conditions, les racines sont associées à un tissu de soutien complet : ciment, ligament périodontaire et os néo-formé (Hu et coll., 2006 a,b). Nous avons poursuivi ce travail en étudiant la possibilité de restaurer la vascularisation de ces réassociations.

#### **a) But du travail**

Le rôle de la vascularisation dans la survie et la croissance d'organes implantés (Nomi et coll., 2002), mais également son rôle plus spécifique dans la formation de la matrice minéralisée nécessaire à la fonctionnalité de la dent, sont à l'origine de cette étude. Initialement nous avons cherché à préciser les similitudes de développement des réassociations tissulaires et cellulaires avec les processus physiologiques chez l'embryon.

Des marqueurs spécifiques pour les cellules endothéliales sont devenus disponibles pour étudier la formation et la fonction des vaisseaux sanguins. Nous avons étudié systématiquement la formation des vaisseaux sanguins au cours du développement dentaire *in vivo*, *in vitro* et dans les réassociations implantées *in vivo* après culture *in vitro*. En effet, les études antérieures ont été consacrées à l'étude de la vascularisation des dents déjà formées ou à un stade avancé du développement. Dans notre cas, nous sommes partis de cellules épithéliales et mésenchymateuses dissociées à partir de germes dentaires au stade capuchon pour reconstituer des dents. Le but était d'essayer de les vasculariser et de déterminer la cinétique et l'origine de cette vascularisation.

Pour détecter les vaisseaux, nous avons utilisé des techniques d'immunofluorescence indirecte. Les anticorps utilisés sont dirigés contre : 1) le VEGF-R2 qui est un récepteur du facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (Vascular endothelial growth factor). Le VEGF agit à tous les stades de l'angiogenèse : il augmente la perméabilité vasculaire, favorise la prolifération et la migration des cellules endothéliales et mobilise les angioblastes. Les cellules endothéliales possèdent des récepteurs membranaires spécifiques pour ce facteur. Ces récepteurs possèdent une activité tyrosine kinase. L'expression de ce facteur et de ses récepteurs est corrélée avec le développement embryonnaire (Cebe-Suarez et coll., 2006); 2) CD31 (PECAM-1) qui est une protéine membranaire exprimée par les cellules endothéliales, située au niveau des jonctions intercellulaires (Ilan and Madri, 2003 ; Fujiwara, 2006). 3) Le collagène de type IV est utilisé pour marquer les membranes basales du germe dentaire et la membrane basale vasculaire.

## **b) Résultats et discussion**

La vascularisation est un système indispensable à l'organogenèse, aux cytodifférenciations et à l'activité mitotique. Elle est donc capitale pour le développement d'une stratégie d'ingénierie tissulaire dentaire. La vascularisation n'ayant pas été étudiée dans le cas de nos réassociations (croissance et minéralisation), nous l'avons comparé dans quatre situations distinctes : développement de la dent *ex vivo* et *in vitro*, développement des réassociations cultivées *in vitro* et après implantation chez la souris adulte en sous cutané et dans les mâchoires (Nait lechguer et coll., 2008).

Nos résultats (*ex vivo*) montrent que les vaisseaux sanguins se mettent en place progressivement dans les différents compartiments de la dent dès le stade capuchon. Au stade de la cloche, les vaisseaux sanguins pénètrent dans l'organe de l'émail à travers l'épithélium dentaire externe, à ce même stade commence la différenciation des odontoblastes et des améloblastes avec la formation de la dentine et de l'émail. Nos résultats (*in vitro*) montrent qu'il est possible d'obtenir le développement d'une couronne dentaire à partir des réassociations entre les cellules épithéliales et les cellules mésenchymateuses avec le maintien

des structures de type vasculaire. De plus l'implantation en sous-cutané de ces cultures permet l'obtention de la rhizogénèse avec la formation du ligament périodontal. Les résultats après implantation indiquent la présence des vaisseaux sanguins tout d'abord autour des implants, ensuite dans la pulpe dentaire et dans l'organe de l'émail. La seule différence entre les molaires et les réassociations implantées est liée à la cinétique. La revascularisation progresse plus rapidement dans les molaires intactes que dans les réassociations. Probablement, ceci est une conséquence des traitements enzymatiques et mécaniques nécessaires à la dissociation des tissus et cellules avant mise en culture des réassociations. Pour déterminer l'origine des vaisseaux sanguins dans les implants, des molaires prélevées chez les embryons de souris CD-1 ont été cultivées pendant 6 jours et implantées chez des souris GFP. Les résultats montrent que les vaisseaux sanguins présents dans les implants étaient tous GFP-positifs, ce qui démontre que les vaisseaux sanguins proviennent de l'hôte. Pour vérifier si ces vaisseaux sanguins étaient impliqués dans le développement d'implants, et non pas dans leur rejet, molaires et réassociations cultivées ont été également implantées chez les souris Nude. Histologiquement, l'aspect des cellules pulpaire et des vaisseaux sanguins des implants Nude n'a montré aucune différence entre les implants réalisés chez CD-1 et chez Nude. Finalement, nous avons montré que l'implantation des molaires et des réassociations cultivées dans le diastème des mâchoires de souris adultes permet le développement des dents avec des couronnes complètes, croissance des racines et l'ensemble du système d'ancrage ainsi que la revascularisation de l'implant.

L'ensemble de ces résultats publiés (Nait lechguer et coll., 2008) montre qu'il est possible de restaurer la vascularisation dans les réassociations cellulaires cultivées, après implantation. Cette condition devait être satisfaite pour permettre le bon déroulement du développement des réassociations, en permettant la croissance des dents et la progression de la formation des matrices dentinaire, amélaire, et du ciment, lorsque les racines se forment.





A. Nait Lechguer<sup>1,2</sup>, S. Kuchler-Bopp<sup>1,2</sup>,  
B. Hu<sup>1,2</sup>, Y. Haïkel<sup>1,2</sup>, and H. Lesot<sup>1\*,2,3</sup>

<sup>1</sup>INSERM UMR 595, Faculté de Médecine, 11, rue Humann, 67085 Strasbourg cedex, France; <sup>2</sup>Dental School, Université Louis Pasteur, Strasbourg, France; and <sup>3</sup>International Collaborating Centre in Oro-facial Genetics and Development, University of Liverpool, School of Dental Sciences, Liverpool, UK ; \*corresponding author, herve.lesot@odonto-ulp.u-strasbg.fr

*J Dent Res* 87(12):1138-1143, 2008

## ABSTRACT

The implantation of cultured dental cell-cell re-associations allows for the reproduction of fully formed teeth, crown morphogenesis, epithelial histogenesis, mineralized dentin and enamel deposition, and root-periodontium development. Since vascularization is critical for organogenesis and tissue engineering, this work aimed to study: (a) blood vessel formation during tooth development, (b) the fate of blood vessels in cultured teeth and re-associations, and (c) vascularization after *in vivo* implantation. *Ex vivo*, blood vessels developed in the dental mesenchyme from the cap to bell stages and in the enamel organ, shortly before ameloblast differentiation. In cultured teeth and re-associations, blood-vessel-like structures remained in the peridental mesenchyme, but never developed into dental tissues. After implantation, both teeth and re-associations became revascularized, although later in the case of the re-associations. In implanted re-associations, newly formed blood vessels originated from the host, allowing for their survival, and affording conditions organ growth, mineralization, and enamel secretion.

**KEY WORDS:** tooth, tissue engineering, vascularization, VEGFR, CD31.

Received March 26, 2008; Last revision September 5, 2008; Accepted September 16, 2008

A supplemental appendix to this article is published electronically only at <http://jdr.iadrjournals.org/cgi/content/full/87/12/1138/DC1>.

# Vascularization of Engineered Teeth

## INTRODUCTION

The engineering of a functional whole tooth is a major challenge (Smith, 2004; Yen and Sharpe, 2008). Recently, the engineering of a full tooth crown *in vitro* was made possible by re-associating dental epithelial cells and mesenchymal cells from the cap stage (Hu *et al.*, 2005a,b). The *in vivo* implantation of these cultured re-associations allowed for further mineralized dentin and enamel deposition, as well as root-periodontium formation (Hu *et al.*, 2006).

Vascularization is important for normal tooth development and function. Although blood vessels play a critical role in the survival of implanted organs, the timing of their development in engineered teeth has not yet been investigated. In this work, we examined blood vessel formation in the mesenchyme and enamel organ successively, from the developing mandibular first mouse molar, the fate of blood vessels in cultured teeth and re-associations, and the progression of revascularization of cultured teeth and re-associations after implantation into adult mice obtained from the Institute of Cancer Research (ICR, Charles River Laboratories, l'Arbresle, France). Finally, we implanted cultured ICR teeth into Green Fluorescent Protein (GFP) mice to determine the origin of blood vessels.

Blood vessels were identified by double-immunostaining for CD31/ Collagen-IV and VEGFR2/Collagen-IV. CD31 (PECAM-1) is expressed by all cells within the vascular compartment and begins to be expressed by endothelial progenitor cells during their differentiation (Hristov *et al.*, 2003). CD31, a specific marker of endothelial cells (Ilan and Madri, 2003), concentrates in cell junctions and plays complementary roles in vascular biology, including angiogenesis, migration, and transport through vessel walls (Woodfin *et al.*, 2007). VEGFR2 (Vascular Endothelial Growth Factor Receptor), a major receptor for VEGF, is essential for vascular endothelial cell formation during embryogenesis and repair. It is the earliest marker of angioblast precursors, endothelial and hematopoietic cells (Coults *et al.*, 2005; Olsson *et al.*, 2006). Collagen IV is a specific marker of basement membrane.

## MATERIALS & METHODS

The mandibular first molars were dissected from ICR embryos at Embryonic Day (ED) 14. All procedures with animals were in compliance with the recommendations of the European Economic Community (86/609/CEE) on the use and care of laboratory animals. For *ex vivo* studies, 64 embryos were used.

### *In vitro* Culture

Intact molars and cell-cell re-associations were cultured. For the re-associations, the dental mesenchyme was dissociated from the dental epithelium, and then both tissues were further dissociated into single cells (Hu *et al.*, 2005b; Appendix 1). Cell-cell re-associations were cultured as previously described (Hu *et al.*, 2005b; Appendix 1). Cultures were stopped after 1, 3, and 6 days for molars

(n = 75) or after 8 and 10 days for re-associations (n = 25).

**In vivo Implantation**

After *in vitro* culture, molars (n = 243) and dental epithelial and mesenchymal cell re-associations (n = 164) were implanted between skin and muscles behind the ears (referred to as ‘subcutaneous’) in ICR, GFP (C57BL/6 from the IGBMC, Illkirch, France), and nude (CD1, Charles River Laboratories) 8-week-old adult mice, or in the mandible of adult ICR mice (cultured molars, n = 17, and re-associations, n = 14). The implantations were maintained for up to 2 wks.

**Immunofluorescence and Histology**

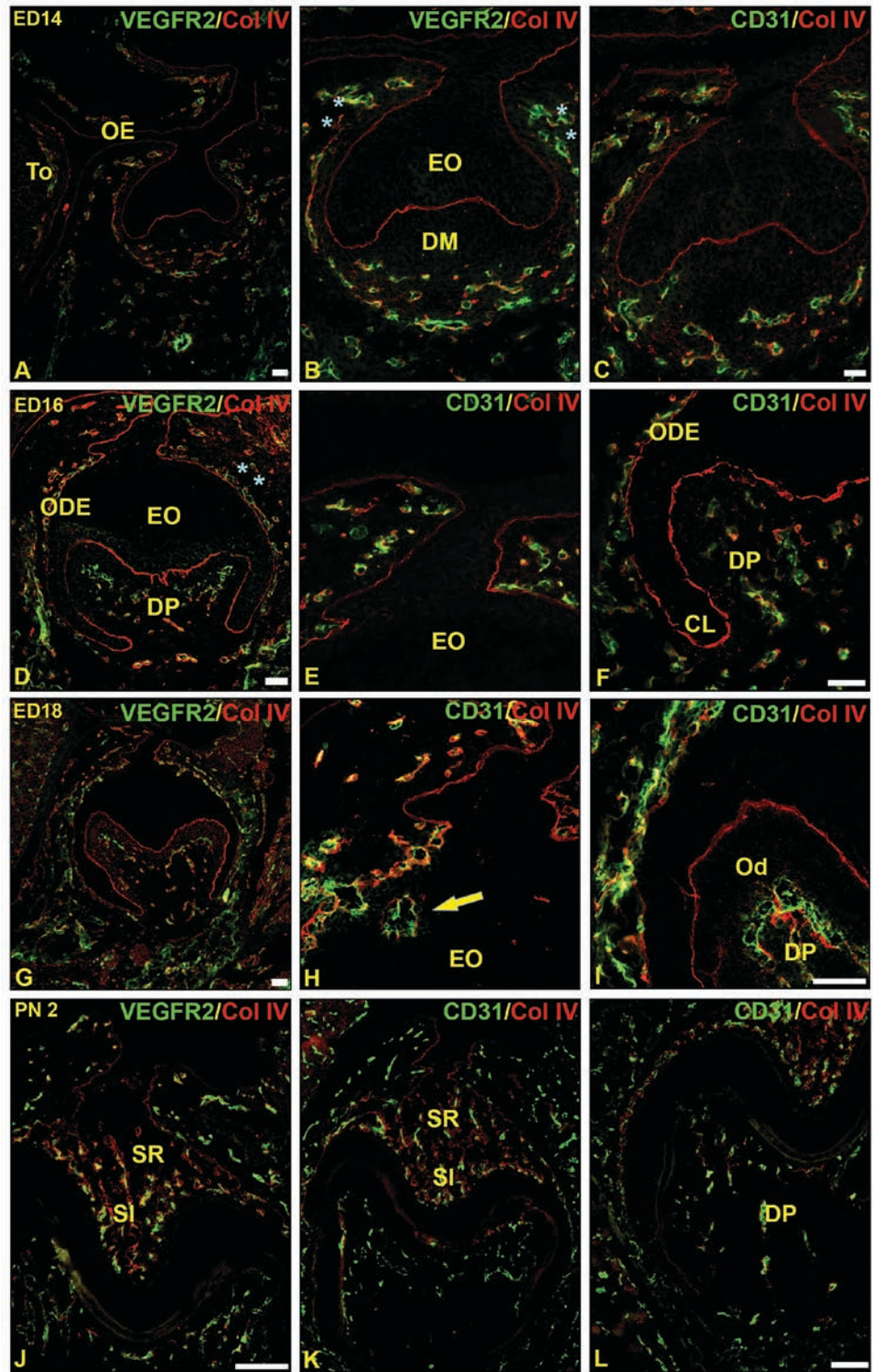
The embryos’ heads were frozen in 2-methylbutane solution (Sigma-Aldrich, Lyon, France), culture tissues were embedded in Tissue-Tek® (Agar Scientific, Saclay, France), and frozen at -30°C. Immunostaining was performed on serial frontal frozen sections (7 µm) with monoclonal rat anti-mouse CD31 (1/100) and VEGFR2 (1/100) (BD Pharmingen, Evry, France) antibodies, and polyclonal rabbit anti-mouse Collagen-IV (1/400) and anti-GFP (1/500) (Abcam®, Cambridge, MA, USA). Sections were incubated for 2 hrs at room temperature with the primary antibodies and for 1 hr with goat anti-rat and chicken anti-rabbit secondary antibodies conjugated to Alexa 488 (1/200) and Alexa 594 (1/500) (Molecular Probes, Invitrogen SARL, Cergy Pontoise, France). Negative controls were performed with corresponding sera instead of the primary antibody.

For histology, samples were fixed in Bouin-Hollande and embedded in paraffin, and 5-µm serial sections were stained with Mallory. For long-term cultures, the samples were demineralized in 4.3% EDTA.

**RESULTS**

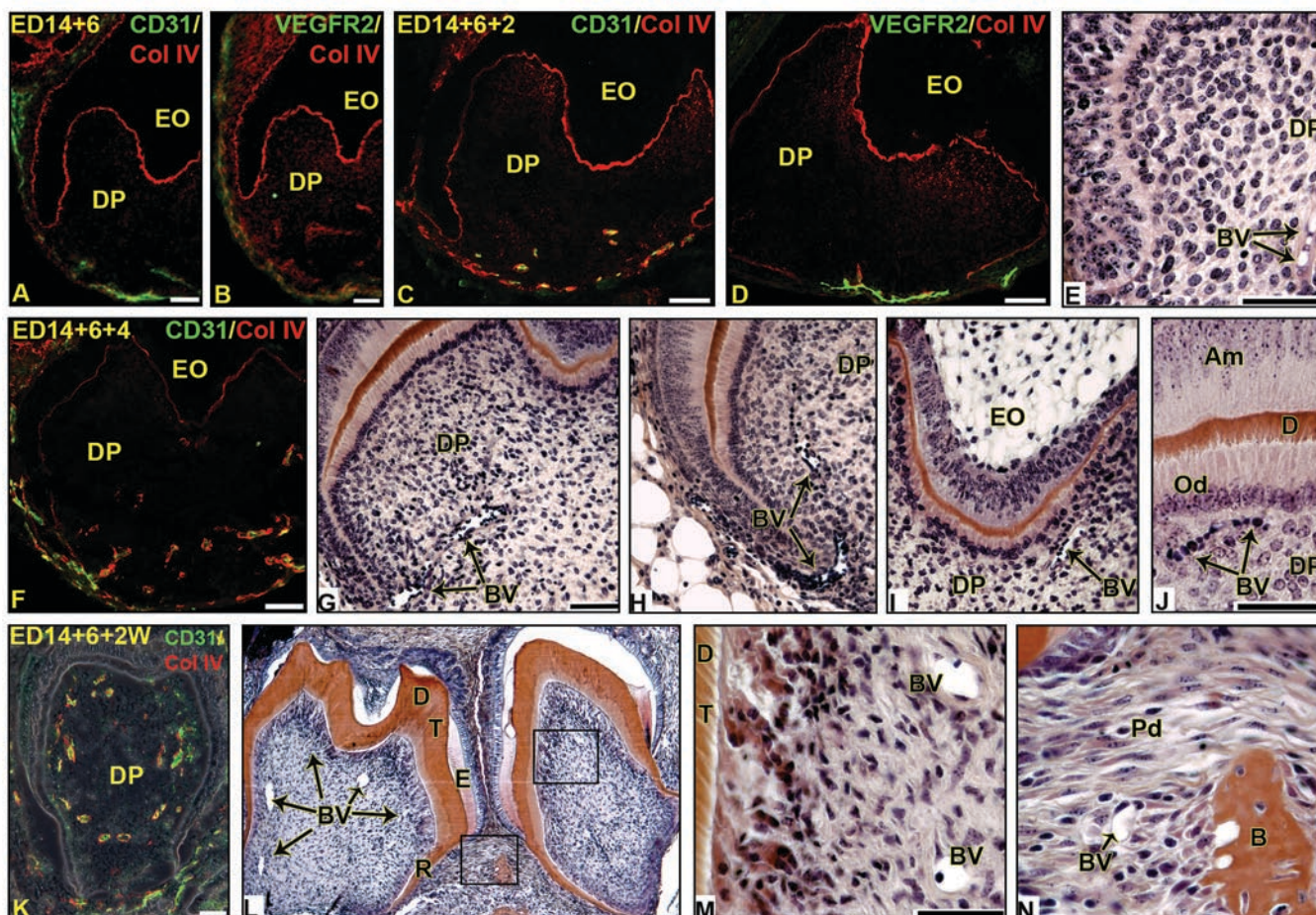
**Vascularization during Molar Development**

At the cap stage (ED14), CD31 and VEGFR2 were detected in the peridental mesenchyme (PDM) and in the mandibular portion of the dental mesenchyme (Figs.



**Figure 1.** Vascularization during mandibular first molar development. Localization of CD31, VEGFR2, and Col IV by immunofluorescence methods on frozen sections of embryonic heads at: cap stage ED14 (A,B,C), early bell stage ED16 (D,E,F), bell stage ED18 (G,H,I), and post-natal day 2 PN2 (J,K,L). At all stages, CD31 and VEGFR2 co-localized with Col IV in different compartments of tooth germs. CL, cervical loop; DM, dental mesenchyme; DP, dental pulp; EO, enamel organ; Od, odontoblast; ODE, outer dental epithelium; OE, oral epithelium; SI, stratum intermedium; SR, stellate reticulum; To, tongue. Arrow in H shows blood vessels entering the enamel organ. Bars = 40 µm.

1A-1C). Both antigens were absent from the enamel organ. At the early bell stage (ED16), CD31 and VEGFR2 were



**Figure 2.** Revascularization of subcutaneously implanted cultured mandibular first molars in adult ICR mice. After 6 days *in vitro*, cultured molar germs (A,B) were implanted for: 2 days (C,D,E), 4 days (F,G,H,I,J), and 2 wks (K,L,M,N). Blood vessels were studied by immunofluorescent localization of CD31 (A,C,F,K), VEGFR2 (B,D), and Col IV (A-D, F,K), and by histology (E,G-J,L-N). Am, ameloblast; B, bone; BV, blood vessel; D, dentin; DP, dental pulp; E, enamel; EO, enamel organ; Od, odontoblast; Pd, periodontium; R, root; T, tubular dentin. Bars = 40  $\mu$ m.

detected in the central part of the dental pulp (Figs. 1D, 1F). Blood vessels were abundant in the PDM and could be detected next to the basement membrane associated with the outer dental epithelium (Figs. 1D-1F), except in the vicinity of the cervical loop (Fig. 1F). The 2 antigens remained absent from the enamel organ (Figs. 1D, 1E).

At the bell stage (ED18), staining for either CD31 or VEGFR2 showed blood vessels in the whole dental pulp (Fig. 1G), reaching the sub-odontoblast cell layer (Figs. 1G, 1I). In the peridental mesenchyme, the blood vessels came into contact with the basement membrane associated with the outer dental epithelium and began to enter the enamel organ (Fig. 1H, arrow).

At post-natal day 2, blood vessels still developed in the dental pulp and were detected in the odontoblast layer (Figs. 1J-1L). The number of blood vessels present in the enamel organ had significantly increased. They were abundant in the stellate reticulum and stratum intermedium and came into contact with ameloblasts (Figs. 1J, 1K).

### Revascularization of Cultured Molars after Implantation in ICR Mice

Before implantation into adult ICR mice, cap-stage molars (ED14) were isolated and cultured for 1 to 6 days *in vitro* (see

complementary information in Appendix 2). After 6 days, they had reached an early bell stage (Figs. 2A, 2B). Double-immunostaining for CD31/ColIV showed a persistence of the 2 antigens in the PDM (Fig. 2A), where the staining for VEGFR2 was extremely weak (Fig. 2B). In the dental pulp (DP) and in the enamel organ (EO), no blood-vessel-like structure could be detected (Figs. 2A, 2B). After implantation, the timing of revascularization was investigated by immunofluorescence and histology.

After 2 days of subcutaneous implantation, odontoblasts had not yet differentiated (Fig. 2E). Blood vessels were observed in the mandibular portion of the DP, either after staining for CD31 and VEGFR2 (Figs. 2C, 2D) or on histological sections (Fig. 2E, arrows). They were absent from the EO (Figs. 2C, 2D). After 4 days, functional odontoblasts were facing polarized ameloblasts (Fig. 2J). Blood vessels entered the DP (Fig. 2H, arrows). They were detected in the central part of the DP (Figs. 2F, 2G) and also in the vicinity of the odontoblast layer (Figs. 2I, 2J). Blood vessels were not yet present in the EO (Figs. 2F, 2I). After 2 wks, ameloblasts had become functional and secreted enamel (Fig. 2L). Root and periodontal tissues had started to develop (Figs. 2L, 2N), which does not occur in our *in vitro* conditions (Hu *et al.*, 2006). Blood vessels could clearly

be identified by immunostaining for CD31 and histology in the DP (Figs. 2K-2M) and the periodontal tissues (Figs. 2K-2N).

### Revascularization of Cultured Epithelial/Mesenchymal Cell Re-associations after Implantation in ICR Mice

Dental epithelial/mesenchymal cell re-associations cultured for 8 days had reached the early bell stage (Figs. 3A, 3B). At this stage, the PDM was positive for CD31 (Fig. 3A), but negative for VEGFR2 (Fig. 3B). No blood vessels were detected in the DP or in the EO (Figs. 3A, 3B and Appendix 2). The progression of vascularization was followed for up to 2 wks after implantation.

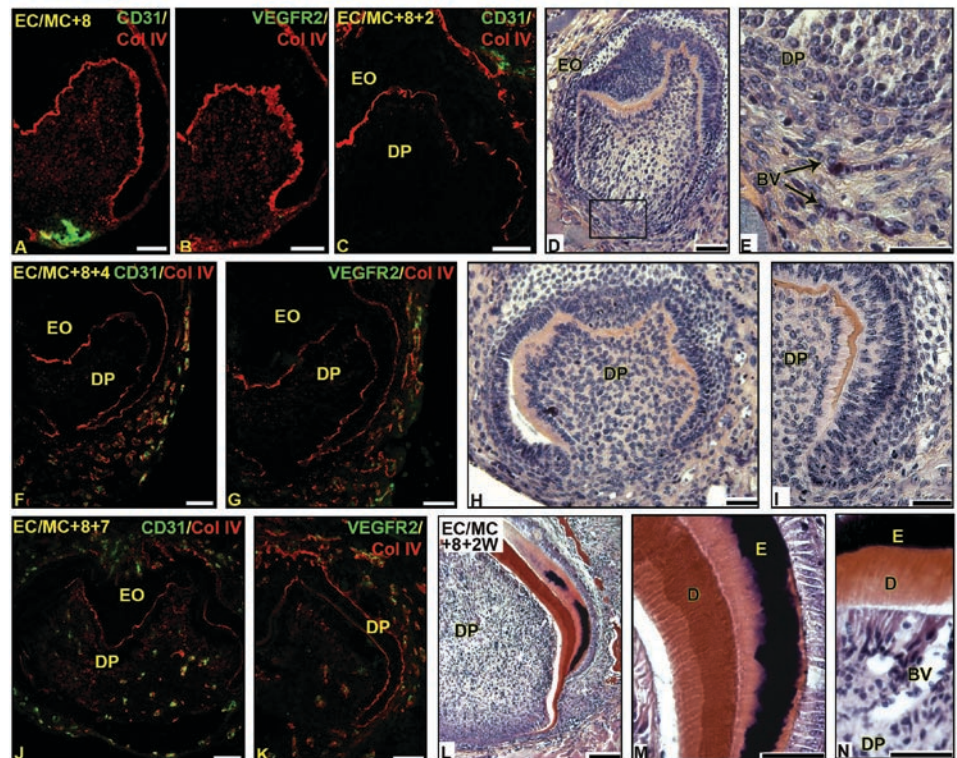
After 2 days of implantation, the re-associations were at the bell stage, with polarized odontoblasts facing pre-ameloblasts (Fig. 3D). Blood vessels were present in the tissues surrounding the implant, but reached neither the DP nor the EO (Figs. 3C-3E). After 4 days, the implanted re-associations showed functional odontoblasts (Fig. 3I). Staining for CD31 and VEGFR2 showed a dense vascularization of the still-condensed peri-implant tissues (Figs. 3F, 3G), which agreed with the histology (Figs. 3H, 3I). However, blood vessels had not yet entered the dental tissues (Figs. 3F-3I).

After 7 days and 2 wks, a thick layer of dentin had been deposited (Figs. 3L-3N), and enamel was secreted (Figs. 3M, 3N). Root and periodontal tissues had started to form (Fig. 3L), which did not occur in our *in vitro* conditions. After 7 days of implantation, CD31 and VEGFR2 were detected in DP and EO (Figs. 3J, 3K). After 2 wks, blood vessels were present in the whole tooth and periodontal tissues (Figs. 3L, 3N). These newly formed blood vessels contained erythrocytes, showing that they were functional (Fig. 3N). Re-associations were revascularized after implantation, but the question remained about the origin of these newly formed blood vessels.

### Origin of Blood Vessels in Implants

When cultured teeth had been implanted for 2 wks in the mandibular diastema of adult mice (Figs. 4A,4B), odontoblasts and ameloblasts were functional (presence of tubular dentin and enamel) (Fig. 4E), and root-periodontium tissues had started to form (Figs. 4C, 4D). Blood vessels were observed in the DP and PDM (Fig. 4D).

To investigate the origin of blood vessels in implants, we cultured molars from ED14 ICR mouse embryos for 6 days and implanted them into adult GFP mice for 2 wks. When collecting the samples, we noted a dense network of blood vessels surrounding the implants under the stereomicroscope (Fig. 4F). Double-staining for CD31 (Fig. 4G) and GFP (Fig.



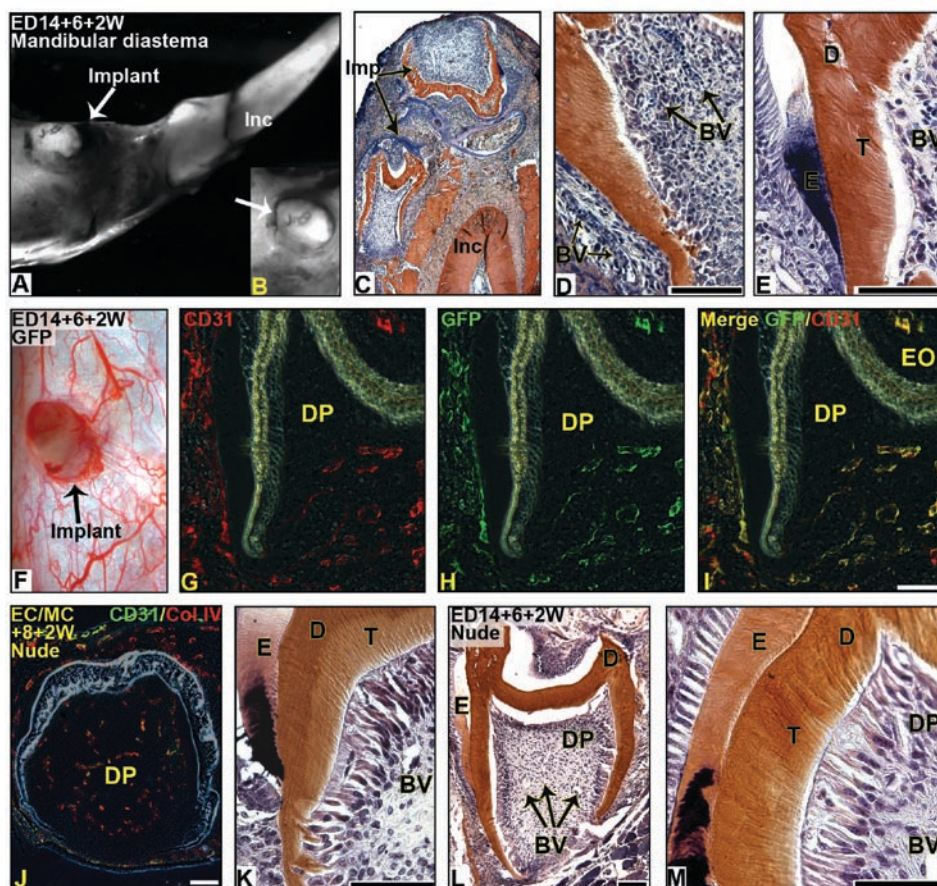
**Figure 3.** Revascularization of cultured epithelial/mesenchymal cell re-associations after subcutaneous implantation in adult ICR mice. Epithelial/mesenchymal cell re-associations were cultured for 8 days *in vitro* prior to implantation for 2 days (C,D,E), 4 days (F,G,H,I), 7 days (J,K), and 2 wks (L,M,N). Blood vessels were localized by immunofluorescent staining for CD31 (A,C,F,J), VEGFR2 (B,G,K), and Col IV (A-C, F,G,H,I,K), and by histology (D,E,H,I,L-N). BV, blood vessel; D, dentin; DP, dental pulp; E, enamel; EO, enamel organ. Bars = 40  $\mu$ m.

4H) and a merged image (Fig. 4I) showed that the blood vessels in the DP and the EO originated from the host.

To check whether these blood vessels are involved in implant development and not rejection, we implanted cultured teeth (Figs. 4J, 4K) and re-associations (Figs. 4L, 4M) into nude mice. After 2 wks, odontoblasts and ameloblasts had secreted tubular dentin (Figs. 4K, 4M), and enamel (Figs. 4K, 4M) occurred as in ICR mice. Root and periodontal tissues had also begun to develop (Figs. 4K, 4L). Blood vessels were present in the periodontal tissues (Figs. 4K, 4L) and the DP, where they reached the odontoblast layer (Figs. 4J-4M). They were positive for CD31 (Fig. 4J).

### DISCUSSION

It is widely accepted that vascularization is essential for organ and tissue development. During organogenesis, blood vessels are critical for bringing nutrients, oxygen, for metabolic exchanges, and for tissue homeostasis (Lammert *et al.*, 2001; Thisse and Zon, 2002). Most of the studies devoted to vascularization during odontogenesis were based on histology and transmission electron microscopy. More recently, markers for endothelial cells or their progenitors became available for the investigation of blood vessel formation. In this study, we investigated blood vessel formation during the development of the mouse mandibular first molar *ex vivo*, as well as in intact molars and dental epithelial/mesenchymal cell re-association



**Figure 4.** Implantation of cultured molars (A-E, F-I, L, M) or epithelial/mesenchymal cell re-associations (J,K) into the mandibular diastema (A-E) or subcutaneously (F-M) in GFP (F-I) or nude (J-M) mice for 2 wks. Histology of implanted cultured molars in the mandibular diastema of adult mice (C-E) showed the full development of teeth, including vascularization. Stereomicroscopic view of the vascular network surrounding an implanted cultured molar germ (F). Immunofluorescent localization of CD31 and GFP in implanted cultured molars in GFP adult mice (G-I) showed the origin of blood vessels. Immunofluorescent localization of CD31 and Col IV (J) and histology (K) of epithelial/mesenchymal cell re-associations (J,K) and histology of implanted cultured teeth (L,M) in nude mice showed normal development of teeth, including vascularization. BV, blood vessel; D, dentin; DP, dental pulp; E, enamel; EO, enamel organ; Imp, implant; Inc, incisor; T, tubular dentin. Bars = 40 μm.

development *in vitro* and after implantation.

However, the kinetics of dental vascularization was not documented in the mouse. Our study confirmed and expanded previous results by systematically describing tooth vascularization from the cap stage to amelogenesis. At the cap stage, the initial vascular network progressed to occupy the mandibular portion of the dental mesenchyme. Meanwhile, other capillaries developed around the dental epithelium. At the bell stage, blood vessels entered the dental pulp. From the late bell stage (ED18), blood vessels crossed the basement membrane in contact with the ODE and entered the enamel organ, 24 hrs before amelogenesis was initiated. During tooth development in other species, blood vessels in relation to odontoblasts have shown distinct changes in their location and number at different stages of dentinogenesis (Josephsen *et al.*, 1974; Yoshida and Ohshima, 1996). In the enamel organ, blood vessels, possibly involved in phosphate transport, approach the SI but do not come into contact with ameloblasts (Sasaki and Garant, 1986; Woltgens *et al.*, 1995). Previously, it has

been shown that BMP-2 induced ameloblast differentiation *in vitro* (Coin *et al.*, 1999). However, immunostaining for BMP-2 did not show storage at the epithelial-mesenchymal junction in regions where ameloblasts had started to differentiate. Furthermore, there is no evidence for the presence of BMP-2 in dentin (Smith and Lesot, 2001), although the transcript is expressed by odontoblasts. The origin of BMP-2 is thus unclear. It has been reported that BMP-2 can be transported and/or secreted by endothelial cells (Langenfeld and Langenfeld, 2004; Csiszar *et al.*, 2005). One function of the vascularization of the enamel organ might thus be to bring the BMP-2 necessary to induce amelogenesis.

The final size of engineered teeth is an important parameter, and vascularization might condition organ growth. The results presented in this paper showed that revascularization of implanted re-associations not only allowed for their survival, but also enabled them to grow. It has been shown that, *in vitro*, the growth of molar germs was reduced, which was correlated with a lengthening of the cell cycle (Ahmad and Ruch, 1987). The absence of blood perfusion in cultured teeth and re-associations should have consequences on their metabolism. Calcium transportation from blood to enamel and dentin is important for their mineralization (Woltgens *et al.*, 1995; Kawamoto and Shimizu, 1997). The rapid

development of blood vessels at the bell stage would allow this function to occur. In contrast, blood vessels were absent from the enamel organ in the cultured molars. *In vitro*, ameloblasts can polarize and secrete enamel proteins; however, this requires specific conditions (Boukari and Ruch, 1981; Fincham *et al.*, 1989; Sakakura *et al.*, 1989).

Cultured molars and re-associations have been implanted, either subcutaneously or in the jaw. Although no attempt was made to stimulate it by the use of exogenous growth factors (for review, see Tan *et al.*, 2006), the revascularization of all dental tissues occurred in all cases. A similar degree of vascularization was observed when molars *ex vivo* and implanted re-associations were compared at a similar stage (Appendix 3). The only difference was related to the timing. After implantation, the revascularization progressed more quickly in teeth than in re-associations, where it was initially retarded. This might be a consequence of tissue dissociation before epithelial/mesenchymal cell culture, as has already been reported for morphogenesis (Hu *et al.*, 2006). The implantation

of ICR molars or re-associations in GFP mice showed that blood vessels present in the dental papilla and enamel organ of implants were GFP-positive, proving that they originated from the host. After interspecific orthotopic transplantation of tooth germs, it has been suggested that host cells might also contribute to pulp and dental follicle formation (Carlile *et al.*, 1998). However, this could not be confirmed after our subcutaneous implantation experiments: No GFP-positive cells were observed in the implanted dental mesenchyme. This discrepancy might be explained by the difference in the site of implantation, since dental cells may remain in the jaw in the case of orthotopic transplantation. Furthermore, immediate transplantation is different from the implantation experiments performed after an intermediary *in vitro* culture. When intact teeth or re-associations were implanted into nude or ICR mice, the aspect of the pulp and blood vessels showed no difference. Thus, the newly formed blood vessels, which formed in cell-cell re-associations, were involved not in implant rejection, but in their development, growth, and survival.

## ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Hervé Gegout for histology, Daniel Metzger from the IGBMC (Illkirch) for GFP mice, and Bernard Senger for statistics. This work was funded by the INSERM, the Louis Pasteur University (Dental School), and by a grant from IFRO2007.

## REFERENCES

- Ahmad N, Ruch JV (1987). Comparison of growth and cell proliferation kinetics during mouse molar odontogenesis *in vivo* and *in vitro*. *Cell Tissue Kinet* 20:319-329.
- Boukari A, Ruch JV (1981). [Behavior of embryonic mouse teeth *in vitro*: preservation of the crown pattern and mineralization]. *J Biol Buccale* 9:349-361 [article in French].
- Carlile MJ, Harrison VT, Lumsden AG, Palmer RM (1998). Development and cell fate in interspecific (*Mus musculus/Mus caroli*) orthotopic transplants of mouse molar tooth germs detected by *in situ* hybridization. *Arch Oral Biol* 43:395-406.
- Coin R, Lesot H, Vonesch JL, Haïkel 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.
- Coultas L, Chawengsaksophak K, Rossant J (2005). Endothelial cells and VEGF in vascular development. *Nature* 438:937-945.
- Csiszar A, Smith KE, Koller A, Kaley G, Edwards JG, Ungvari Z (2005). Regulation of bone morphogenetic protein-2 expression in endothelial cells: role of nuclear factor-kappaB activation by tumor necrosis factor-alpha, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, and high intravascular pressure. *Circulation* 111:2364-2372.
- Fincham AG, Bessem CC, Bringas P Jr, Hu YY, Snead ML, Slavkin HC (1989). Amelogenesis *in vitro*: a model for studies of epithelial postsecretory processing during tissue-specific extracellular matrix biomineralization. *Differentiation* 41:62-71.
- Hristov M, Erl W, Weber PC (2003). Endothelial progenitor cells: mobilization, differentiation and homing. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 23:1185-1189.
- Hu B, Nadiri A, Bopp-Kuchler S, Perrin-Schmitt F, Lesot H (2005a). Dental epithelial histomorphogenesis *in vitro*. *J Dent Res* 84:521-525.
- Hu B, Nadiri A, Bopp-Kuchler S, Perrin-Schmitt F, Wang S, Lesot H (2005b). Dental epithelial histo-morphogenesis in the mouse: positional information versus cell history. *Arch Oral Biol* 50:131-136.
- Hu B, Nadiri A, Bopp-Kuchler S, Perrin-Schmitt F, Peters H, Lesot H (2006). Tissue engineering of tooth crown, root and periodontium. *Tissue Eng* 12:2069-2075.
- Ilan N, Madri JA. (2003). PECAM-1: old friend, new partners. *Curr Opin Cell Biol* 15:515-524.
- Josephsen K, Fejerskov O, Theilade J (1974). Age changes in juxtaodontoblastic capillaries of rat molars. *Scand J Dent Res* 82:574-578.
- Kawamoto T, Shimizu M (1997). Pathway and speed of calcium movement from blood to mineralizing enamel. *J Histochem Cytochem* 45:213-230.
- Lammert E, Cleaver O, Melton D (2001). Induction of pancreatic differentiation by signals from blood vessels. *Science* 294:564-567.
- Langenfeld EM, Langenfeld J (2004). Bone morphogenetic protein-2 stimulates angiogenesis in developing tumors. *Mol Cancer Res* 2:141-149.
- Olsson AK, Dimberg A, Kreuger J, Claesson-Welsh L (2006). VEGF receptor signalling in control of vascular function. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7:359-371.
- Sakakura Y, Fujiwara N, Sugawara M, Nawa T (1989). *In vitro* effects of calcitonin and/or parathyroid hormone on odontogenesis of mouse embryonic molars. *J Dent Res* 68:1279-1284.
- Sasaki T, Garant PR (1986). An ultrastructural study of the papillary layer and its vascular bed in the kitten enamel organ. *Anat Rec* 214:353-364.
- Smith AJ (2004). Tooth tissue engineering and regeneration—a translational vision! *J Dent Res* 83:517.
- Smith AJ, Lesot H (2001). Induction and regulation of crown dentinogenesis: embryonic events as a template for dental tissue repair? *Crit Rev Oral Biol Med* 12:425-437.
- Tan Q, Steiner R, Hoerstrup SP, Weder W (2006). Tissue-engineered trachea: history, problems and the future. *Eur J Cardiothorac Surg* 30:782-786.
- Thisse C, Zon LI (2002). Organogenesis-heart and blood formation from the zebrafish point of view. *Science* 235:457-462.
- Woltgens JH, Lyaruu DM, Bronckers AL, Bervoets TJ, Van Duin M (1995). Biomineralization during early stages of the developing tooth *in vitro* with special reference to secretory stage of amelogenesis. *Int J Dev Biol* 39:203-212.
- Woodfin A, Voisin MB, Nourshargh S (2007). PECAM-1: a multi-functional molecule in inflammation and vascular biology. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 27:2514-2523.
- Yen AH, 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.

## RESEARCH REPORTS

Biological

A. Nait Lechguer<sup>1,2</sup>, S. Kuchler-Bopp<sup>1,2</sup>,  
B. Hu<sup>1,2</sup>, Y. Haikel<sup>1,2</sup>, and H. Lesot<sup>1\*,2,3</sup>

<sup>1</sup>INSERM UMR 595, Faculté de Médecine, 11, rue Humann, 67085 Strasbourg cedex, France; <sup>2</sup>Dental School, Université Louis Pasteur, Strasbourg, France; and <sup>3</sup>International Collaborating Centre in Oro-facial Genetics and Development, University of Liverpool, School of Dental Sciences, Liverpool, UK ; \*corresponding author, herve.lesot@odonto-ulp.u-strasbg.fr

*J Dent Res* 87(12):1138-1143, 2008

### APPENDICES

#### APPENDIX 1

##### Methods for Tissue and Cell Dissociations and Cell-Cell Re-associations

ICR (Institute Cancer Research) female mice were mated overnight, and the detection of the vaginal plug was considered as Embryonic Day 0 (ED0). The embryos were harvested from 1 pregnant mouse at ED14, and the mandibular first molars were isolated by stereomicroscopy (Leica MZ9, Leica Microsystems SA, Rueil-Malmaison, France). The dental epithelia and mesenchyme were dissociated from all tooth germs by 1% trypsin (Difco, BD Biosciences, Le-Pont-de-Claix, France) in DMEM/F12 (Gibco, Invitrogen SARL, Cergy Pontoise, France) at 4°C (Schmitt *et al.*, 1999). After tissue separation, the dental epithelium and mesenchyme were further dissociated into single cells and passed through a 70- $\mu$ m nylon filter.

The quality of the tissue and cell dissociations was checked by histology (see Hu *et al.*, 2005). After dissociation, cells were pelleted at 9000 g for 2 min, and the pellets of epithelial cells and mesenchymal cells were re-associated and cultured. For each re-association,  $6.1 \pm 1.5 \times 10^4$  epithelial cells were recombined with  $13.5 \pm 0.5 \times 10^4$  mesenchymal cells. The living cells were counted in a Neubauer hemocytometer after being stained with trypan blue.

##### Cultures

The re-associations were cultured from 8 to 10 days on a semi-solid medium, which consisted of DMEM/F-12 (Gibco, Invitrogen SARL, Cergy Pontoise, France) containing 20% fetal bovine serum (Cambrex Bioscience Verviers SPRL, Verviers, Belgium), and supplemented with ascorbic acid (0.18 mg/mL, Merck, Darmstadt, Germany), L-glutamine (2 mM, Gibco, Invitrogen SARL, Cergy Pontoise, France), penicillin/streptomycin (50 units/mL, Gibco, Invitrogen SARL, Cergy Pontoise, France), and agar (0.36%, Sigma-Aldrich Chimie SARL, Lyon, France). Cultures were incubated at 37°C in a humidified atmosphere of 5% CO<sub>2</sub>. The medium was changed every 2 days.

## Vascularization of Engineered Teeth

#### Implantation Experiments

After a culture period of 6 days for tooth germs or 8 days for epithelial and mesenchymal cell re-associations, the cultured samples were implanted between skin and muscles behind the ears or in the mandibular diastema of ICR, nude, and GFP mice (from 18 to 20 wks old). The implantations were maintained *in vivo* for 2 days to 2 wks between skin and muscles, or for 2 wks in the diastema. Immunostaining was performed with samples from 3 to 12 independent experiments.

#### APPENDIX REFERENCES

- Hu B, Nadiri A, Bopp-Kuchler S, Perrin-Schmitt F, Lesot H (2005). Dental epithelial histomorphogenesis *in vitro*. *J Dent Res* 84:521-525.  
Schmitt R, Lesot H, Vonesch JL, Ruch JV (1999). Mouse odontogenesis *in vitro*: the cap-stage mesenchyme controls individual molar crown morphogenesis. *Int J Dev Biol* 43:255-260.

**Appendix Table.** Number of Experiments and Samples for Each Condition: *ex vivo*, *in vitro* Culture and Implants

<i>Ex vivo</i>	ED14*	ED16	ED18	PN2	Total
Number of experiments	28	7	17	12	64
<i>In vitro</i> (molar germs)	ED14+1	ED14+3	ED14+6	Total	
Number of experiments	4	3	5	12	
Number of samples	20	15	40	75	
<i>In vitro</i> (EC/MC Re-associations**)	EC/MC+8	EC/MC+10	Total		
Number of experiments	3	4	7		
Number of samples	12	13	25		
Implantation (molar germs)	ED14+6+2	ED14+6+4	ED14+6+2W	Total	
Number of experiments	12	12	25	49	
Number of samples	45	45	170	260	
Implantation (EC/MC Re-associations)	EC/MC+8+2	EC/MC+8+4	EC/MC+8+7	EC/MC+8+2W	Total
Number of experiments	8	8	9	26	51
Number of samples	28	25	21	104	178
Total number of cultured molars					335
Total number of re-associations					203

\* ED, embryonic day; \*\*EC/MC, epithelial cells/mesenchymal cells.



## APPENDIX 2

## Fate of Blood Vessels in Cultured Molars and Epithelial/Mesenchymal Cell Re-associations

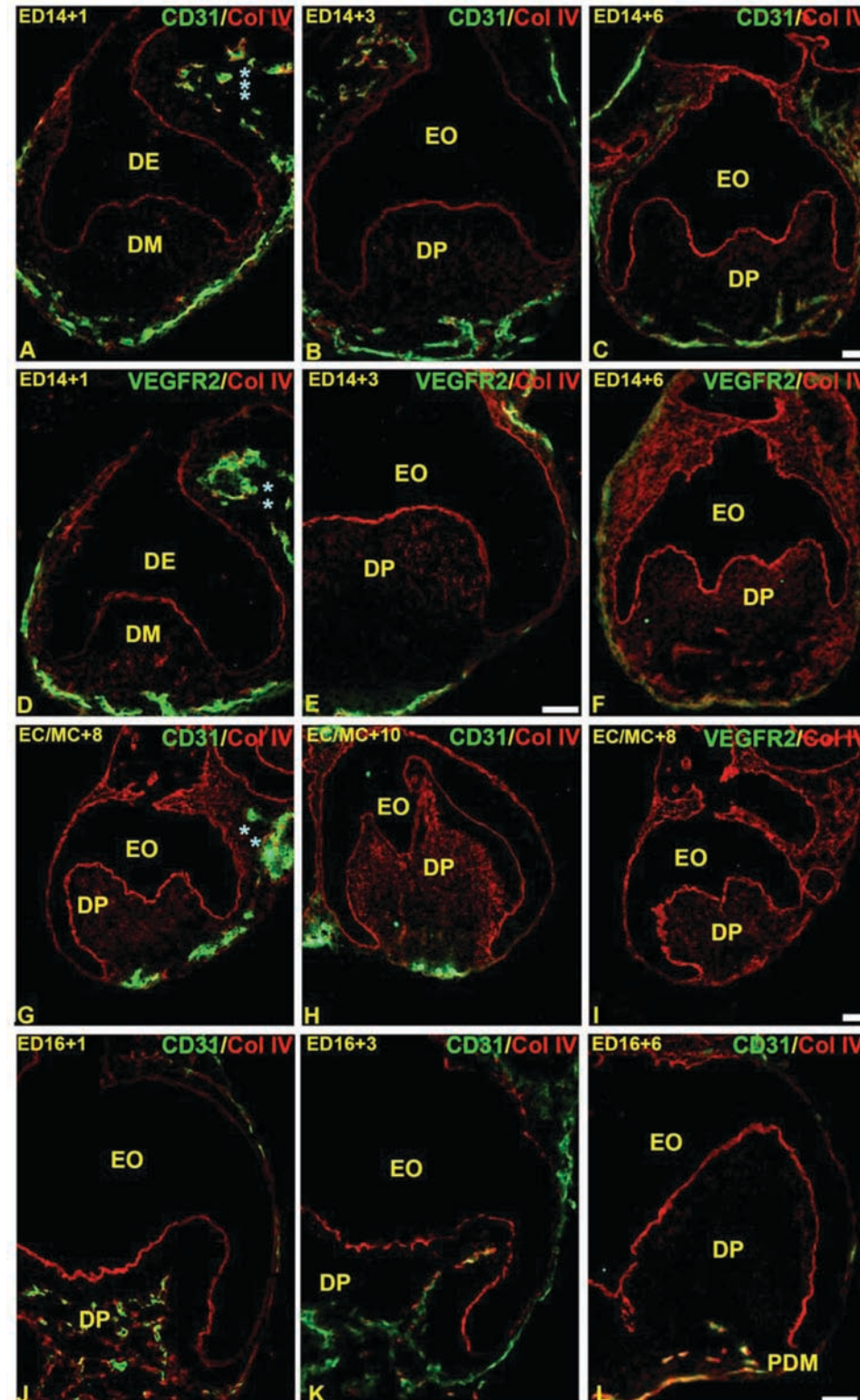
Cap-stage molars (ED14) were isolated and cultured for up to 6 days *in vitro*. After 1 day, CD31 and VEGFR2 were detected in the peridental mesenchyme (Appendix 2, Figs. A,

D: stars). However, they could not be detected in the dental mesenchyme or in the enamel organ. After 3 days, blood-vessel-like structures were maintained in the peridental mesenchyme. The dental pulp and the enamel organ remained negative for CD31 and VEGFR2 (Appendix 2, Figs. B, E). After 6 days, double-immunostaining for CD31/ColIV persisted throughout the peridental mesenchyme

(Appendix 2, Fig. C). However, the immunostaining for VEGFR2 in the peridental mesenchyme was very weak (Fig. 2F) compared with that observed *ex vivo* at the early bell stage (Fig. 1D, main paper). No blood-vessel-like structures could be detected in the dental pulp and in the enamel organ (Appendix 2, Figs. C, F).

When dental epithelial/mesenchymal cell re-associations were cultured for 8 and 10 days, CD31 (Appendix 2, Figs. G, H), but not VEGFR2 (Appendix 2, Fig. I), was detected in the peridental mesenchyme. No blood vessels were found in the dental pulp or in the enamel organ (Appendix 2, Figs. G-I).

We performed experiments to investigate the fate of blood vessels in cultures of tooth germs from the early bell stage (ED16). At this stage (onset of the culture), double-staining for CD31 and ColIV showed that blood vessels were already present in the dental papilla (Figs. 1D, 1F, main paper). No blood vessels were observed in the enamel organ. From 1 to 6 days of culture, the tooth germs developed, but not the blood



**Appendix Figure.** Fate of blood vessels during *in vitro* culture of mandibular first molars (A-F, J-L) and epithelial/mesenchymal cell re-associations (G-I). Immunolocalization of CD31 (A-C, G, H, J-L), VEGFR2 (D-F, I) and Col IV (A-L) on frozen sections (7  $\mu$ m) of ED14 molar germs cultured for 1 day (A, D), 3 days (B, E), and 6 days *in vitro* (C, F), and on ED14 epithelial/mesenchymal cell re-associations cultured for 8 days (G, I) and 10 days *in vitro* (H). Early bell-stage molars (ED16) were isolated and cultured up to 6 days *in vitro*. After 1 day (J) and 3 days (K), CD31 was detected in the DP and PDM. After 6 days, immunostaining for CD31 persisted only in the PDM (L). DE, dental epithelium; DM, dental mesenchyme; DP, dental pulp; EO, enamel organ; PDM, peridental mesenchyme. \* In A, D and G indicate peridental mesenchyme. Bars = 40  $\mu$ m.

vessels (Appendix 2, Figs. K, L). There was no sign of blood vessel development to accompany cusp growth (Appendix 2, Figs. J-L). As observed for cultured tooth germs from ED14, blood-vessel-like structures were temporarily maintained in the peridental mesenchyme.

### APPENDIX 3

#### Vascular Density in the Dental Pulp *ex vivo* and in the Mesenchyme of Engineered Teeth

We attempted to compare vascularization in developing and engineered teeth quantitatively by counting blood vessels and measuring the surface of the dental papilla using ImageJ software (Version 1.40g, National Center for Biotechnology Information [NCBI], Bethesda, MD, USA). Measurements were performed on 29 non-consecutive serial histological sections for teeth *ex vivo*, 60 sections for implanted cultured teeth, and 65 sections for the re-associations. Sections were obtained from 4 independent implants in each case. Results were presented as

mean  $\pm$  SD. Statistical significance was evaluated by one-way ANOVA (SigmaStat, Jandel GmbH, Erkrath, Germany).

The density of blood vessels was  $3.38 \pm 1.44 \cdot 10^{-4}$  vessel/ $\mu\text{m}^2$  in the mandibular first molar at PN2. In molars from ED14 cultured for 6 days and implanted for 2 wks, the density was  $4.33 \pm 0.99 \cdot 10^{-4}$  vessel/ $\mu\text{m}^2$  ( $P = 0.87$ ). Finally, in cell-cell re-associations cultured for 8 days and implanted for 2 wks, the density was  $3.73 \pm 0.88 \cdot 10^{-4}$  vessel/ $\mu\text{m}^2$  ( $P = 0.51$ ).

Although there was increased vascularization of implanted teeth, the results showed a similar degree of vascularization *ex vivo* and in implanted cell-cell re-associations. However, important regional variations exist in the density of blood vessels during tooth development. For example, the density varies from 1 to 2 blood vessels/ $\mu\text{m}^2$  from the mesial to the distal part of a mandibular first molar at PN2. Although this may be taken into account during *ex vivo* development, where it is possible to orient the sections, similar orientation in the sectioning cannot be performed after *in vitro* culture or implantation experiments.



## IV.2. L'INNERVATION

Plusieurs études ont examiné le rôle possible de l'innervation dans l'initiation du développement dentaire, (Kollar et Lumsden, 1979; Lumsden et Davies, 1983, 1986). Pour étudier ce point, Lumsden et Buchanan (1986) ont cultivé des arcs mandibulaires disséqués chez des embryons de souris de 9 jours. Ce stade précède l'arrivée des axones et le début de la formation des dents. Les résultats montrent que l'odontogenèse est possible en absence d'innervation.

Si l'innervation ne semble pas être indispensable au déroulement des premiers stades du développement dentaire, selon l'opinion actuelle, elle reste importante pour que les dents soient physiologiquement fonctionnelles. Les fibres nerveuses se dirigent vers la pulpe dentaire où elles forment un réseau dense dans la région subodontoblastique, jouant une fonction essentiellement sensorielle (pour revue voir Hildebrand et coll., 1995). Ultérieurement, elles atteignent les odontoblastes permettant la réponse de ces cellules à des stimuli externes (mécaniques, thermiques, électriques et osmotiques) (Magloire et coll., 2009). Six différents types de fibres nerveuses sensorielles innervent la dent : A-beta, A-delta-fast, A-delta-slow, et trois types de fibre C (Byers et coll., 2003). Ces fibres proviennent du système trigéminal, et du système nerveux sympathique. Elles diffèrent par leurs mécanismes d'activation et de transmission neurochimique. Hormis la fonction sensorielle, les fibres nerveuses participent 1) à la régulation physiologique et pathologique du flux sanguin (vasorégulation), 2) aux réactions inflammatoires par le jeu d'interactions avec les cellules immunitaires pulpaires, et 3) aux processus de réparation et régénération tissulaire (Byers et Narhi, 1999 ; Byers et coll., 2003). Une autre zone cible pour les axones sensoriels du système trigéminal est le ligament parodontal, qui relie la dent à l'os alvéolaire. A ce niveau les fibres nerveuses jouent un rôle important dans la proprioception, indispensable au fonctionnement des mâchoires (Hildebrand et coll., 1995).

Sur le plan moléculaire, plusieurs facteurs neurotrophiques interviennent dans l'innervation de la dent. NGF via son récepteur p75 permettent la survie et la croissance de certains groupes de neurones. D'autres molécules, telles que les éphrines ou les Sémaphorines, sont indispensables pour le guidage des nerfs. Les Sémaphorines les plus intéressantes pour l'odontogenèse sont la semaphorine 3A (SEMA 3A) qui repousse les axones et inversement la SEMA 7A qui les attire (Luukko et coll., 1997).

### **a) Objectifs de cette étude**

L'étude développée dans le chapitre précédent ayant montré qu'il était possible de vasculariser les réassociations CE/CM, l'objectif de ce travail était d'examiner la possibilité d'innover ces réassociations. Pour suivre les cellules nerveuses, nous avons choisi un anticorps dirigé contre la périphérine, une protéine des filaments intermédiaires, présente principalement dans les neurones du système nerveux périphérique (Lariviere et Julien, 2004).

Comprendre les mécanismes moléculaires de la mise en place de l'innervation dans la pulpe dentaire normale est une étape capitale avant de pouvoir réinnover nos implants. Pour cela nous avons abordé trois points complémentaires :

- 1) Nous avons cherché à suivre la mise en place de l'innervation ainsi que la localisation de plusieurs molécules impliquées dans la régulation de ce processus : SEMA 7A, SEMA3A, NGF et p75. Ce travail *ex vivo* a été effectué sur la première molaire inférieure de souris CD-1;
- 2) Dans la mesure où il est possible de reproduire le développement dentaire *in vitro*, nous avons cherché à suivre le devenir des nerfs et des molécules régulatrices de l'innervation dans les germes dentaires et dans les réassociations après culture *in vitro*;
- 3) Nous avons examiné la possibilité de réinnover nos explants : a) *in vitro*, en les mettant en co-culture avec les DRG (dorsal root ganglion) ; b) en les implantant avec et sans les DRG. Les DRG sont largement utilisés comme modèle du système nerveux périphérique (pour revue, voir Kress et Reeh, 1996 et Vyklicky et Knotkova-Urbancova, 1996).

## **b) Matériel et méthodes**

Le matériel utilisé, les techniques de prélèvement des germes dentaires, de dissociations/réassociations, de culture, d'implantation et d'immunofluorescence sont détaillés dans le chapitre Matériel et Méthodes général (Nait Lechguer et coll., 2008, 2009).

### **○ Prélèvement des ganglions dorsaux (dorsal root ganglion, DRG)**

Les ganglions sont prélevés chez des embryons au 10<sup>ème</sup> jour de gestation au niveau des vertèbres cervicales supérieures. En effet, les ganglions sont au début de leur développement et sont capables de former des axones aussi bien en culture qu'après implantation (He et Baas, 2008).

### **○ Co-culture**

Nous avons cultivé les réassociations CE/CM et les germes de molaires intacts pendant 8 et 6 jours respectivement dans notre milieu de culture habituel dont la composition est la suivante : DMEM/F-12 (Gibco), supplémenté en acide ascorbique (0,18 mg/ml, Merck), L-Glutamine (2mM, Gibco), pénicilline/streptomycine (50 unités/ml, Gibco), sérum de veau foetal (20%) et solidifié par de l'agar (0,36%, Sigma). Le milieu de culture est changé tous les deux jours. Par la suite le milieu habituel a été modifié pour permettre aux DRG de pousser. Ces derniers ont été rajoutés à la culture à proximité des explants. Les co-cultures ont été maintenues sur milieu semi-solide à 37°C dans une étuve à CO<sub>2</sub> (5%) en atmosphère humide. Le DMEM/F12 (Gibco) est supplémenté en acide ascorbique (0,18 mg/ml, Merck), L-Glutamine (2mM, Gibco), pénicilline/streptomycine (50 unités/ml, Gibco), NGF (50 ng/ml, BD Pharmigen), 10% sérum de cheval et solidifié par de l'agar (0,36%, Sigma). Le milieu de culture est changé tous les deux jours.

○ **Implantation**

Après 6 et 8 jours de culture *in vitro*, les échantillons ont été implantés avec ou sans les DRG en sous-cutané dans une zone située derrière l'oreille chez les souris CD-1 âgées de 18 à 20 semaines.

Les anticorps primaires utilisés dans cette étude sont résumés dans le tableau 1. Pour révéler les anticorps primaires, nous avons utilisé les anticorps secondaires (Molecular Probes) : Un anti-rat Alexa 488 (dilution 1/200, pendant 2h), anti-chèvre et anti-lapin Alexa 594 (dilution 1/500, pendant 1h).

**Tableau 1** : Les anticorps primaires utilisés.

<b>ANTICORPS DIRIGE CONTRE :</b>	<b>TYPE</b>	<b>DILUTION DANS LE PBS</b>	<b>TEMPS D'INCUBATION TEMPERATURE AMBIANTE</b>
<b>Périphérine</b> Chemicon international	Polyclonal de lapin	1 /500	2h
<b>CD 31</b> Pour marquer les cellules endothéliales vasculaires BD Biosciences Pharmigen	Monoclonal de rat	1 /100	2h
<b>SEMA 7A</b> Abcam	Polyclonal de lapin	1/100	2h

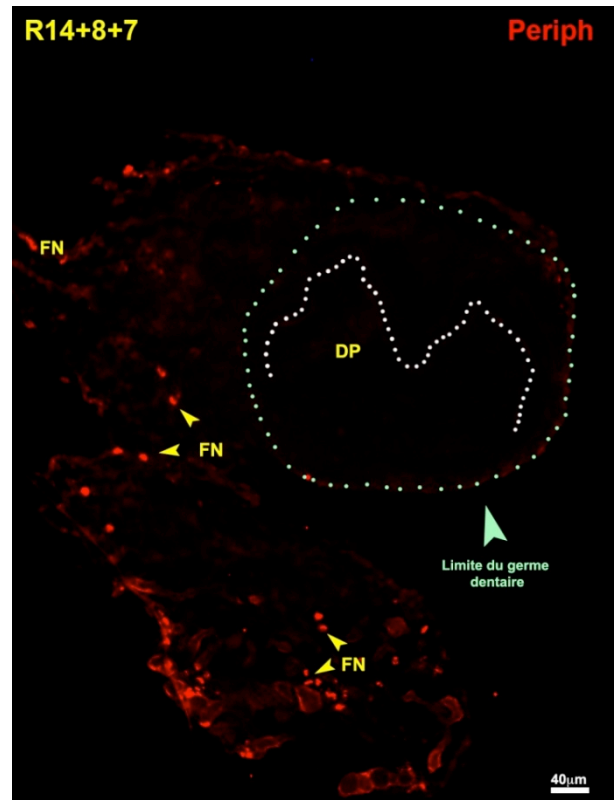
<b>SEMA 3A</b> Santa cruz	Polyclonal de chèvre	1/100	2h
<b>NGF</b> Abcam	Polyclonal de lapin	1/300	2h
<b>p75</b> Abcam	Polyclonal de lapin	1/200	la nuit à 4°C



### c) Résultats

#### ○ Innervation des réassociations cellules-cellules après implantation

Pour compléter nos résultats sur la vascularisation de réassociations implantées, nous avons cherché à détecter la présence des fibres nerveuses par immunolocalisation de la périphérine sur coupes congelées de réassociations CE/CM cultivées 8 jours et implantées 7 jours (Fig. 6) à 2 semaines (Fig. 7) en sous-cutané chez des souris adultes CD-1 (n=23). Alors que les tissus de la souris hôte autour des implants sont innervés (Fig. 6), les fibres nerveuses n'ont pu être détectées ni dans la pulpe dentaire ni dans les tissus périodontaires (Fig. 6 et 7). Nous avons également testé un anticorps anti-neurofilaments H (Abcam), les résultats obtenus sont identiques (résultats non présentés).

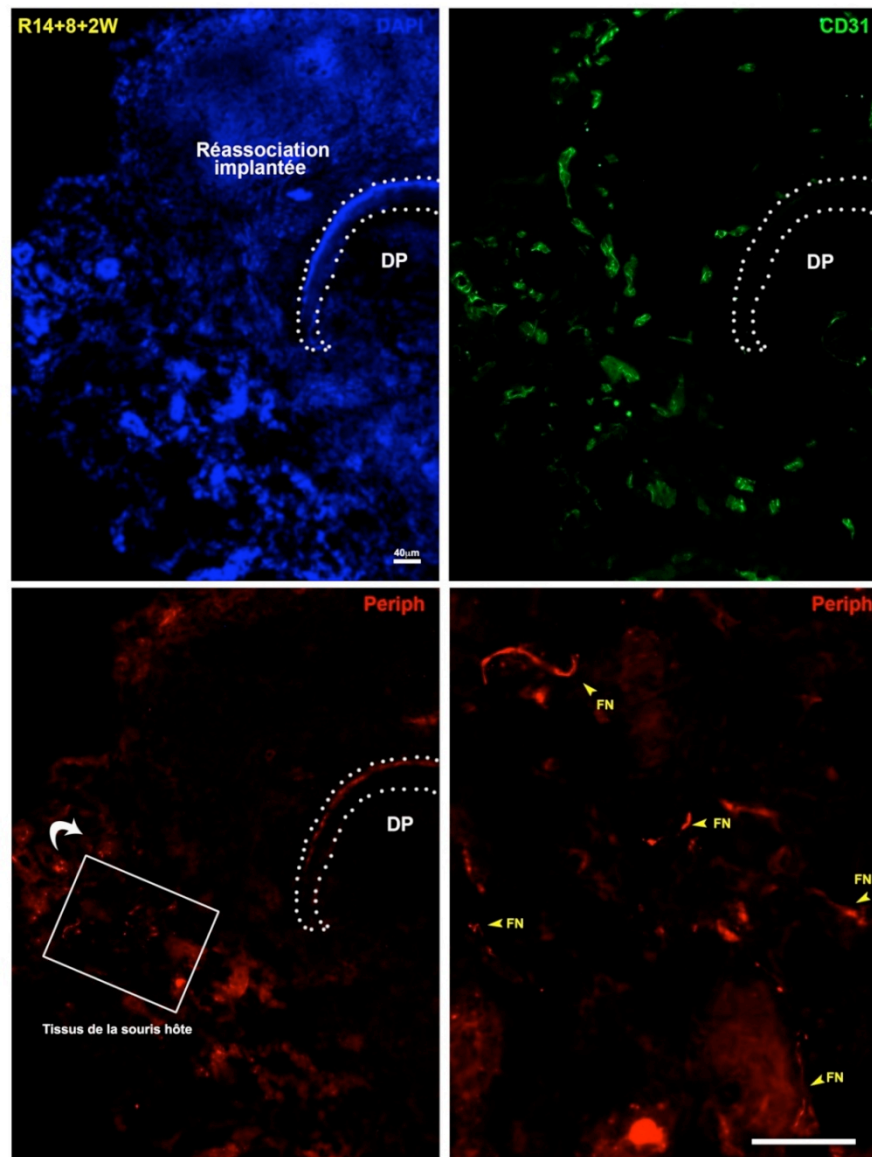


**Figure 6** : Immunolocalisation de la périphérine sur coupes congelées de réassociations CE/CM cultivées 8 jours et implantées de 7 jours.

FN : fibres nerveuses ; DP : pulpe dentaire

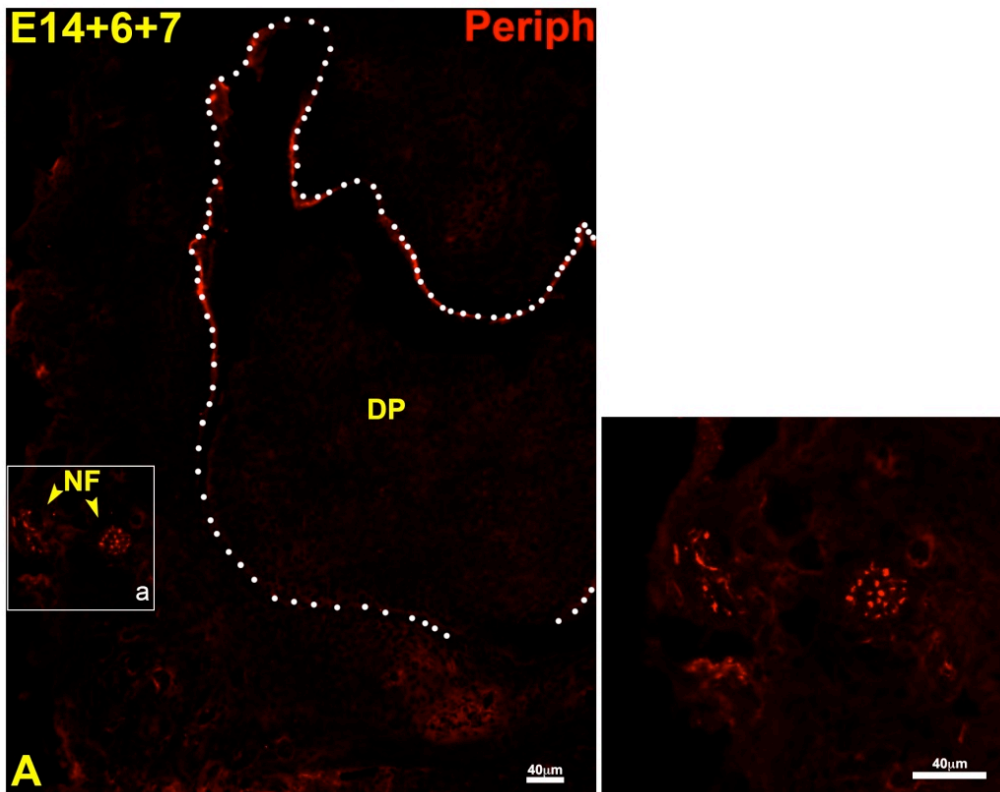
#### ○ Innervation des germes molaires intacts après implantation

Pour savoir si l'absence de l'innervation pouvait être liée aux étapes de dissociation/réassociation, des germes molaires intacts prélevés au jour 14 et cultivés 6 jours ont été implantés en sous-cutané chez les souris CD-1 adultes. Après 7 jours, l'immunolocalisation de la périphérine montre que seul le tissu de la souris hôte contient des fibres nerveuses, ni la pulpe ni les tissus périodontaires des dents implantées ne sont innervés (Fig. 8).



**Figure 7** : Immunolocalisation de la périphérine sur coupes congelées de réassociations CE/CM cultivées 8 jours et implantées de 2 semaines.

FN : fibres nerveuses ; DP : pulpe dentaire



**Figure 8** : Immunolocalisation de la périphérine sur coupes congelées de germes de la première molaire inférieure prélevé à 14 j, cultivées 7 jours et implantées 7j.

FN : fibres nerveuses ; DP : pulpe dentaire

Ces résultats négatifs pourraient être dû au stade de développement du matériel implanté (réassociation CE/CM ou germes de molaires intacts), incompatible avec l'innervation. Pour tester ce point, nous avons analysé la progression de l'innervation de la première molaire inférieure au cours du développement.

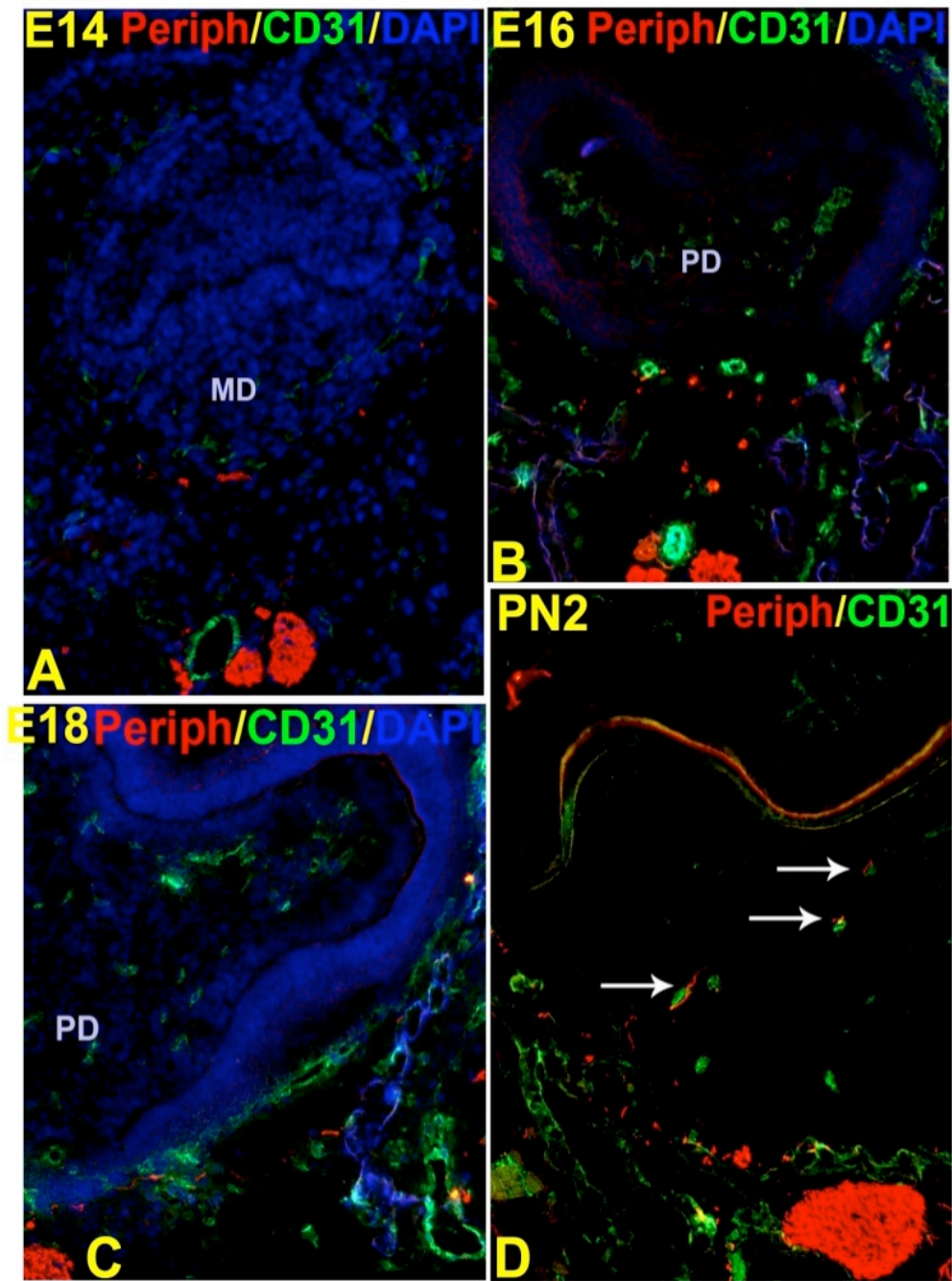
- **Mise en place de l'innervation au cours du développement dentaire *ex vivo*.**

Au 14<sup>ème</sup> jour (E14) de la gestation, les germes de la première molaire inférieure sont au stade de capuchon. A ce stade, la périphérine est détectée à proximité de la partie inférieure du mésenchyme périodentaire, à l'extérieur du sac dentaire (Fig. 9 A). Dans le mésenchyme dentaire, aucun marquage n'a été détecté (Fig. 9 A).

Aux 16<sup>ème</sup> et 18<sup>ème</sup> jours embryonnaires (E16 et E18), les germes de la première molaire inférieure sont aux stades de cloche précoce et tardive respectivement. Le nombre de fibres nerveuses augmente dans le mésenchyme périodentaire (Fig. 9 B,C). La pulpe dentaire, reste négative (Fig. 9 B,C).

À deux jours après la naissance (PN2), le marquage de la périphérine persiste dans le mésenchyme périodentaire. (Fig. 9 D). À ce stade, les fibres nerveuses pénètrent dans la pulpe dentaire et dans un certain nombre de cas, sont associées à des micro-vaisseaux (Fig. 9 D flèches).

À tous les stades, les structures vasculaires marquées par le CD31 et le nerf mandibulaire marqué par la périphérine sont à proximité l'un de l'autre (Fig. 9 A-C).



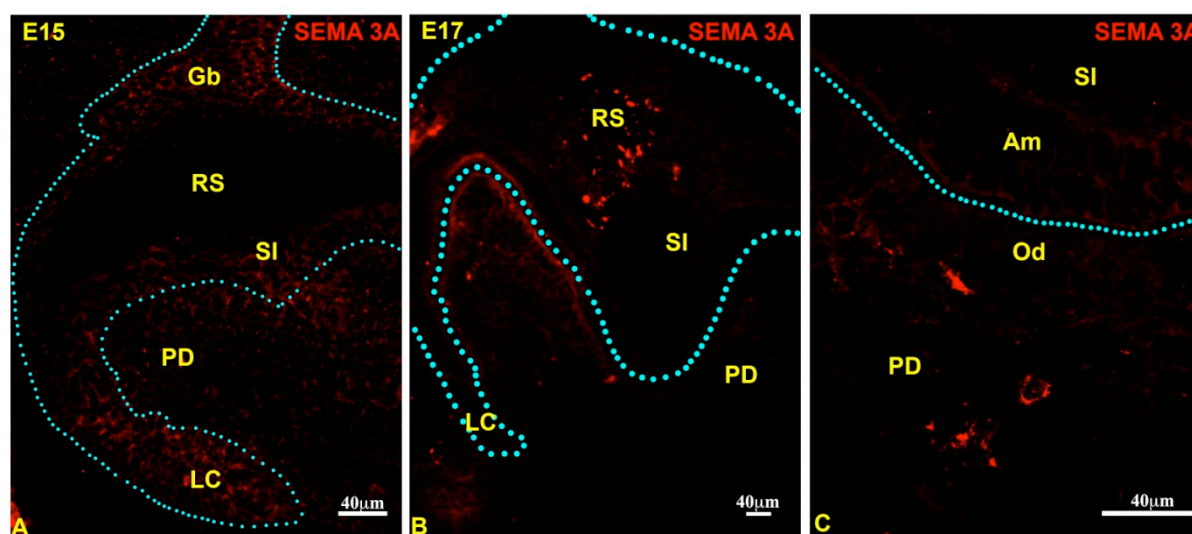
**Figure 9** : Mise en place de l'innervation durant le développement dentaire ex vivo  
 Immunolocalisation de la peripherine sur coupes congelées des germes de premières  
 molaires inférieures de E14 à PN2

MD : Mesenchyme dentaire ; PD pulpe dentaire.

- **Localisations de molécules régulant l'innervation au cours du développement dentaire *ex vivo***

### **Sémaphorine 3A**

Nous avons cherché la localisation de la SEMA 3A par immunofluorescence indirecte sur des coupes de premières molaires inférieures depuis le stade E14. Ce n'est qu'à partir du 15<sup>ème</sup> jour embryonnaire (E15), que l'on observe un faible marquage pour la SEMA 3A dans la pulpe dentaire, dans l'épithélium dentaire interne, dans le stratum intermedium, dans le gubernaculum et dans la lèvre cervicale (Fig. 10 A). Au 17<sup>ème</sup> jour embryonnaire (E17), le marquage est présent dans l'organe de l'émail au niveau du réticulum stellaire (Fig. 10 B,C) et au sommet des cuspides du côté mésenchymateux et dans les préaméloblastes au pôle au contact de la membrane basale (Fig. 10 B).

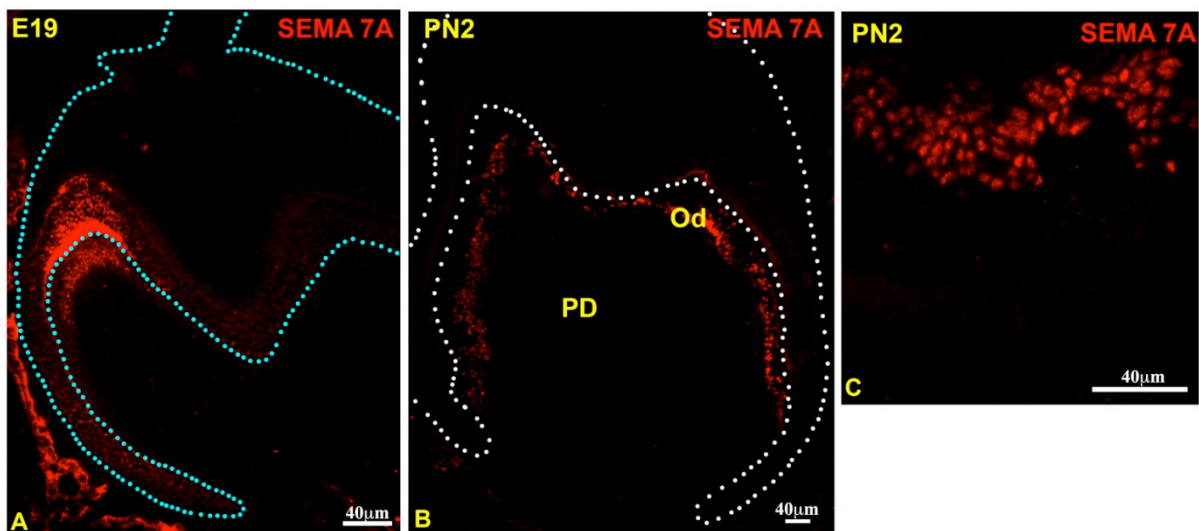


**Figure 10** : Immunolocalisation de la SEMA 3A sur coupes congelées des germes de premières molaires inférieures de E15 et E17.

Am : améloblastes ; Gb : gubernaculum ; LC : lèvre cervicale ; Od : odontoblastes ; PD : pulpe dentaire ; RS : réticulum stellaire ; SI : stratum intermedium.

## Sémaphorine 7A

La localisation de la SEMA 7A a été suivie depuis le stade E14. C'est à partir du 19<sup>ème</sup> jour embryonnaire (E19), que la SEMA 7A est détectable. A ce stade il y a un fort marquage dans la couche des odontoblastes ainsi que dans les améloblastes, toutefois restreint au sommet de la cuspidé linguale ou sont situées les cellules les plus avancées dans la différenciation (Fig. 11 A). De plus, avec le développement ce marquage s'étend dans de la couche odontoblastique, comme on peut le voir dans les germes de la première molaire inférieure à PN2 (Fig. 11 B,C).



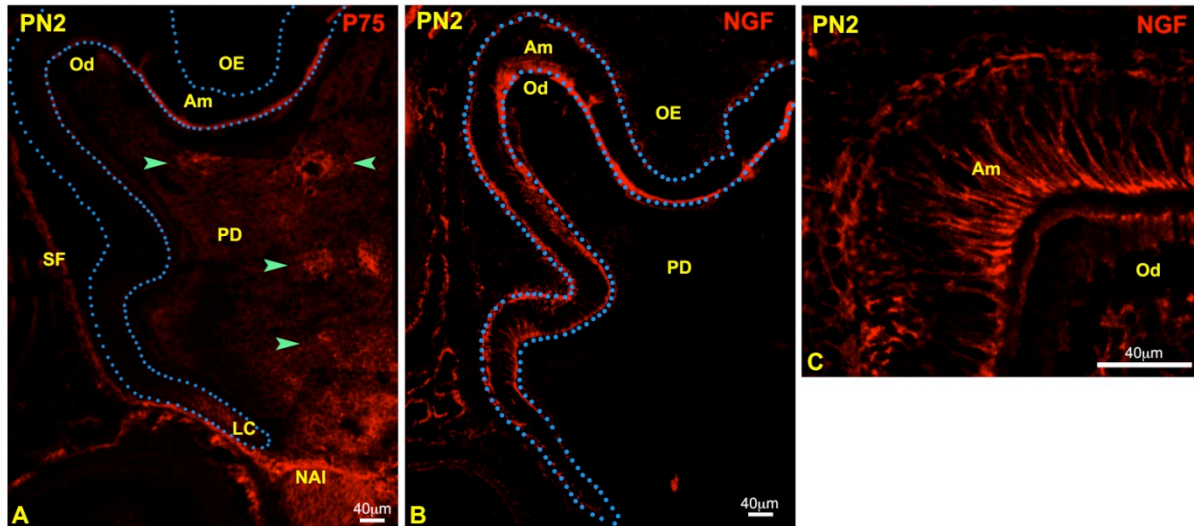
**Figure 11** : Immunolocalisation de la SEMA 7A sur coupes congelées des germes de premières molaires inférieures de E19 et PN2.

Od : odontoblastes ; PD : pulpe dentaire.

## NGF et p75

Nous avons cherché à localiser NGF au début de l'entrée des nerfs dans la pulpe dentaire (PN2). NGF est principalement présent au niveau de la couche améloblastique (Fig. 12 B,C). Le marquage est particulièrement intense au niveau du pôle sécréteur des améloblastes polarisés (Fig. 12 C). Le stratum intermedium est également positif. Au niveau des odontoblastes le marquage pour NGF est beaucoup plus discret (Fig. 12 C), son intensité est identique à ce que l'on observe dans les cellules pulpaire sous-jacentes. A ce stade, p75

(récepteur de NGF) est présent dans l'ensemble de la pulpe dentaire, où le marquage est hétérogène (Fig. 12 A).



**Figure 12** : Immunolocalisation de p75 et NGF sur coupes congelées des germes de premières molaires inférieures à PN2.

Am : améloblastes ; LC : lèvre cervicale ; NAI : nerf alvéolaire inférieur ; Od : odontoblastes ; OE : organe de l'émail ; PD : pulpe dentaire ; SF : sac folliculaire.

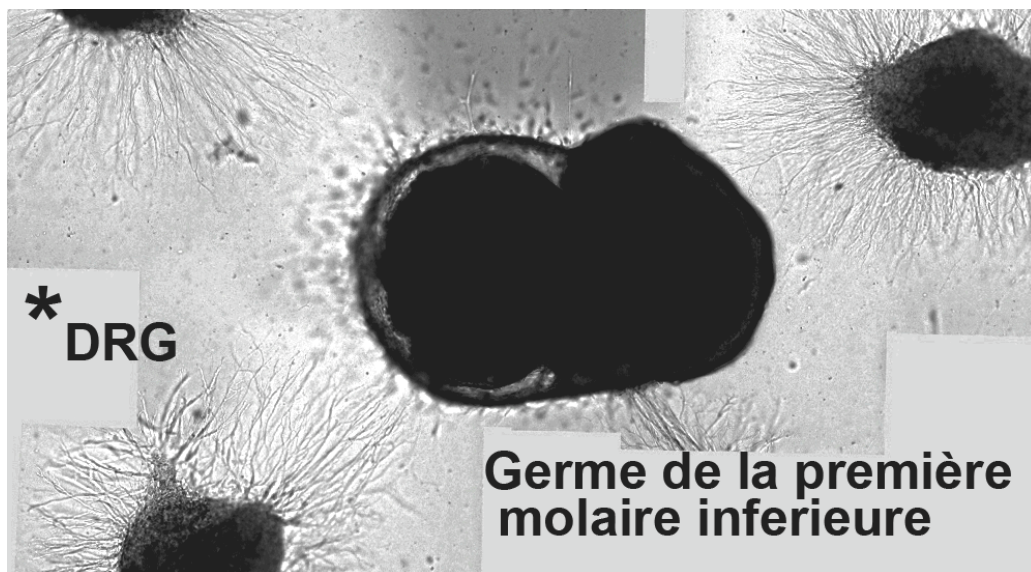
- **Possibilité de l'innervation au cours du développement dentaire dans les cultures *in vitro***

Après 6 et 8 jours de culture *in vitro*, les germes molaires intacts et les réassociations CE/CM (E14+6 et R14+8), atteignent le stade de cloche. Dans les deux types de cultures, la périphérine n'a été détectée ni dans la pulpe dentaire ni dans l'organe de l'émail (résultats non présentés). Cela est en accord avec les observations faites *ex vivo* (Fig. 9 C).

La localisation des molécules régulant l'innervation n'a pas été possible sur des coupes de réassociations ou de germes molaires cultivés suite à un problème technique lié aux anticorps utilisés.



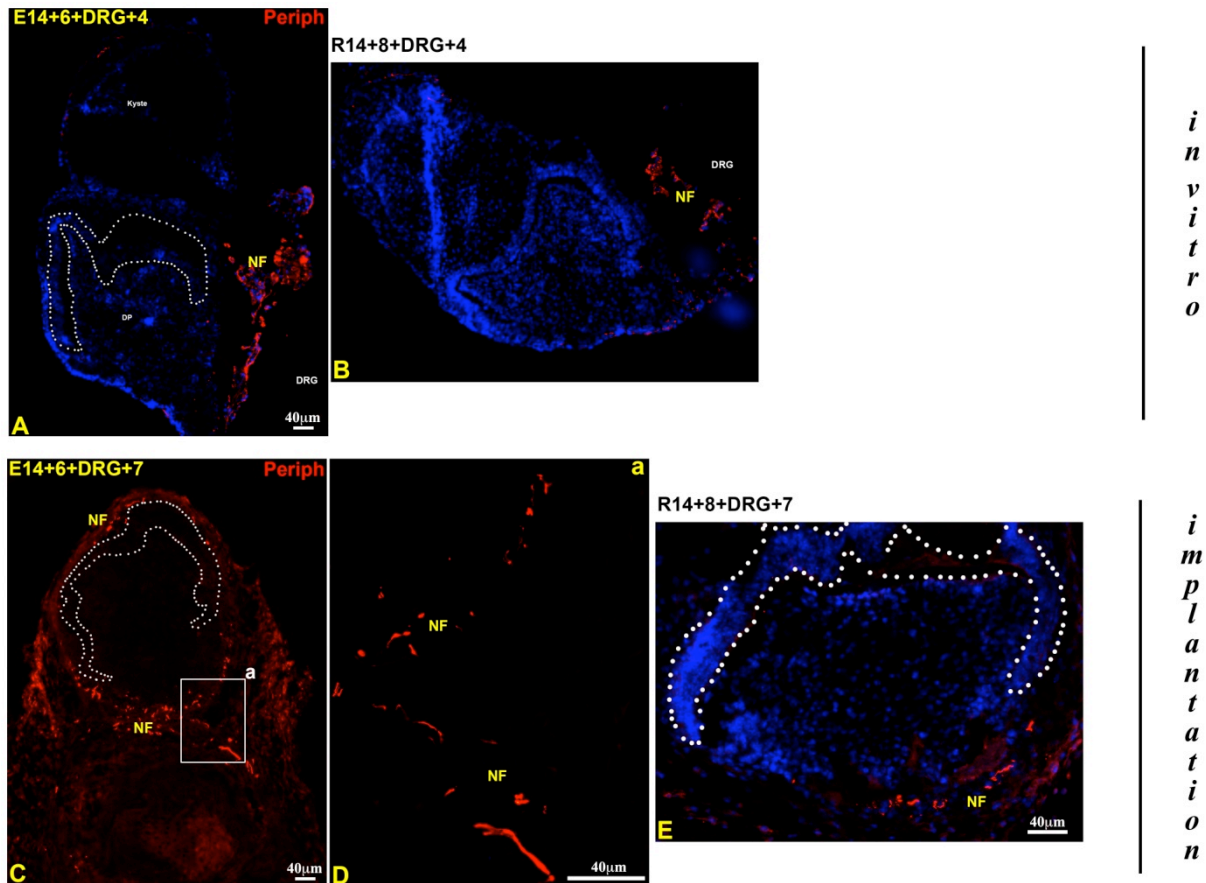
L'absence d'innervation des réassociations et des germes molaires intacts en culture, était prévisible du fait de l'absence des nerfs responsables de l'innervation de la dent. Pour palier ce problème nous avons réalisé des co-cultures de dents ou de réassociations avec des DRG (Dorsal Root Ganglia) prélevés chez des embryons de souris au 10<sup>ème</sup> jour de gestation.



**Figure 13** : Co-culture de germes de première molaire inférieure E14 avec des DRG (prélevés chez les embryons de 10 jours) pendant 6 jours sur milieu semi-solide.

Après 6 jours de culture pour les germes de molaires intacts et 8 jours pour les réassociations, les DRG ont été disposés à proximité des explants et maintenus 4 jours de co-culture. Les axones des DRG poussent vers les explants (Fig. 13), mais n'atteignent pas la pulpe dentaire comme le montre l'immunomarquage à la périphérie (Fig. 14 A). Les mêmes résultats ont été obtenus lorsque les DRG étaient co-cultivés avec les réassociations CE/CM (Fig. 14 B). Pour vérifier que les conditions *in vitro* n'étaient pas limitantes par elles-mêmes, des réassociations CE/CM ou des molaires intacts et des réassociations cultivées ont été implantées chez des souris adultes au contact de DRG prélevés.

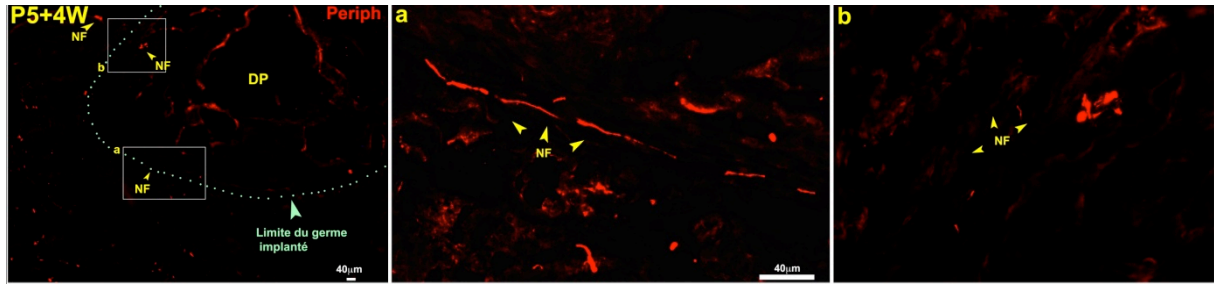
Après 7 jours d'implantation, l'immunomarquage de la périphérine montre que les axones poussent dans les tissus de la souris hôte en périphérie des tissus dentaires, mais sans pénétrer dans la pulpe dentaire ni dans le mésenchyme périodentaire (Fig. 14 C, D, E).



**Figure 14** : Immunolocalisation de la périphérine sur des coupes congelées des co-cultures des germes des premières molaires inférieures et les DRG *in vitro* et après implantation.

DP : pulpe dentaire ; NF : fibres nerveuses.

Ces résultats nous amènent à penser que certains facteurs moléculaires s'opposent à la croissance des fibres nerveuses dans les tissus dentaires. Nous avons implanté pour une durée de 4 semaines des germes dentaires sans culture préalable et prélevés à PN5, un stade compatible avec l'innervation.



**Figure 15 :** Immunolocalisation de la périphérine sur des coupes congelées des germes des premières molaires inférieures prélevés à PN5 et après 4 semaines d’implantation.

DP : pulpe dentaire ; NF : fibres nerveuses.

L’utilisation d’anticorps anti-périphérine montre qu’après 4 semaines d’implantation, les fibres nerveuses sont présentes dans les tissus périimplantaires de la souris hôte et également au niveau de la limite du germe dentaire comme on peut le voir sur le plus fort grossissement de la zone a de la Fig. 15a. Quelques fibres nerveuses ont également été localisées au niveau du parodonte du germe implanté (Fig. 15 b). La pulpe dentaire reste négative pour la périphérine (Fig. 15).

#### **d) Discussion**

La dent est un organe richement innervé par des axones issus du ganglion trigéminal et aussi du système nerveux sympathique originaire du ganglion cervical supérieur. La mise en place de l'innervation dentaire débute très tôt au cours de l'odontogenèse. Fried et coll., 2007 supposent que la mise en place de ces deux types d'innervation est contrôlée par des mécanismes différents et que leur chronologie de progression dans les tissus dentaires est différente. L'innervation des pulpes des premières molaires inférieures de souris commence 48h après que les odontoblastes deviennent post-mitotiques. Ils sont alors fonctionnels et produisent la prédentine et la dentine. Au fur et à mesure que progresse la formation des tissus minéralisés coronaires, le nombre de fibres nerveuses augmente. Elles sont principalement localisées le long des vaisseaux sanguins dans la partie inférieure de la pulpe et au niveau de la couche subodontoplastique coronaire (Luukko et coll, 1997). Nos résultats sont en accord avec cette cinétique de mise en place de l'innervation dans les premières molaires de souris.

La compréhension des mécanismes moléculaires du contrôle du développement dentaire chez l'embryon devrait permettre d'innover les dents obtenues par des techniques d'ingénierie dentaire. Plusieurs études ont montré que les cellules pulpaires sécrètent différents facteurs neurotrophiques, dont certains jouent un rôle important pour la mise en place de l'innervation (Mitsiadis et coll. 1992 ; Kettunen et coll., 2005). Les premières molécules décrites au cours de l'odontogenèse ont été : le facteur de croissance nerveuse (NGF), le facteur neurotrophique dérivé du cerveau (BDNF) et les neurotrophines (Luukko et coll., 1997). Ces facteurs contrôlent la survie des neurones, le guidage axonal, et régulent la densité de l'innervation. Il a été également montré que ces molécules sont exprimées de manière transitoire et disparaissent avant l'achèvement de l'innervation du complexe dentino-pulpaire (Fried et coll., 2000).

Nos résultats confirment que la localisation des Sémaphorines 3A et 7A se fait selon des patrons différents. La Sémaphorine 3A est détectée au stade de la cloche précoce, essentiellement dans le mésenchyme, puis, plus on avance dans les stades, plus le marquage diminue. Cela pourrait s'expliquer par le rôle de cette molécule dans l'inhibition de la

croissance nerveuse dans la pulpe dentaire au cours des stades jeunes du développement. La Sémaphorine 3A disparaîtrait donc pour permettre aux axones issus du nerf alvéolaire de pénétrer dans la pulpe dentaire (Luukko et coll., 1997). La Sémaphorine 7A, est présente essentiellement au niveau de la couche odontoblastique. De plus, les résultats de Maurin et coll., (2005), chez l'homme, démontrent une corrélation entre l'expression de la Sémaphorine 7A et la mise en place de l'innervation. En effet, lorsque les fibres nerveuses ont été identifiées au sein de la couche odontoblastique, l'expression de la Sémaphorine 7A dans les odontoblastes était particulièrement importante. En revanche, lorsque l'innervation de cette zone était structurée, l'expression de la Sémaphorine 7A par les odontoblastes était plus faible. La mise en place de l'innervation est fortement liée à la différenciation de l'odontoblaste (Mitsiadis et coll., 1995). Il est donc probable que l'odontoblaste participe au contrôle de l'innervation par des signaux moléculaires locaux.

Les odontoblastes sont des cellules issues des crêtes neurales (Miletich et Sharpe, 2004), sécrétant la matrice dentinaire (Ruch et coll., 1995). Il est largement admis que les odontoblastes jouent aussi un rôle majeur dans la transduction sensorielle (Magloire et coll., 2009). Ils sont entourés par un réseau dense de fibres nerveuses sensibles. Pour autant, la nature précise des interactions entre les odontoblastes et les fibres nerveuses n'est pas connue.

Alors que nous avons réussi à restaurer la vascularisation après implantation des réassociations CE/CM, nous n'avons pas pu mettre en évidence la présence de fibres nerveuses ni dans les cultures de ces réassociations, ni dans les cultures des molaires intactes ni dans les implants *in vivo*. Pour essayer d'y palier, ou au moins de rechercher l'existence possible de limitations techniques, nous avons poursuivi notre travail par des aspects complémentaires au niveau cellulaire.

Les travaux de Lillesaar et Fried (2004) et Lillesaar et coll, (1999) *in vitro*, ont montré que lorsque le mésenchyme ou l'épithélium embryonnaire dentaire sont cultivés à proximité de ganglions trigéminaux (TG) prélevés, les axones des TG sont attirés par le mésenchyme et

pas par l'épithélium. Cette attraction a été expliquée par la sécrétion de facteurs neurotrophiques par les cellules pulpaire.

La pulpe dentaire ayant une innervation mixte trigéminal et sympathique provenant des ganglions cervicaux supérieurs, notre hypothèse est que le système sympathique commence à fonctionner dans les pulpes dentaires avant le système trigéminal. En effet, le système sympathique est impliqué dans l'homéostasie qui au cours de développement dentaire doit intervenir avant la fonction sensitive. En complément des travaux de Lillesaar et Fried (2004) et Lillesaar et coll, (1999), nous avons cultivé des germes dentaires intacts ou des réassociations avec des ganglions dorsaux prélevés au niveau des cervicales. Ces ganglions sont impliqués dans l'innervation sympathique. Nos résultats montrent que, comme pour les TG, les axones DRG poussent vers les échantillons, mais sans atteindre la pulpe dentaire comme le montre l'immunolocalisation de la périphérine.

Plusieurs études ont montré qu'il est possible d'obtenir une réinnervation après transplantation des dents en site hétérotopique (Higuchi et coll., 2008). La densité et le diamètre des fibres nerveuses dans les dents transplantées sont inférieurs à ce que l'on observe pour les dents normales (Byers et coll., 1992). Par ailleurs, il a été montré que la régénération des nerfs ne se fait correctement que dans les zones où les odontoblastes, la couche cellulaire sous-jacente et les vaisseaux sanguins sont restés intacts (Byers et coll., 1992). Dans nos conditions l'implantation des réassociations en sous-cutané chez la souris adulte permet le début de la formation de la racine (Hu et coll., 2006 a,b). D'autre part, au cours de l'odontogenèse, les fibres nerveuses pénètrent dans la pulpe à partir de PN2, stade auquel la différenciation des odontoblastes et des améloblastes est terminée et la rhizogenèse est initiée. Ces conditions semblaient favorables pour obtenir l'innervation des pulpes dentaires. La région utilisée pour l'implantation pouvant néanmoins représenter un paramètre limitant, nous avons co-implanté nos explants cultivés au contact des DRG prélevés. Après implantation, les axones poussent dans les tissus périimplantaires de la souris hôte, sans jamais être détectés dans les tissus dentaires.

Plusieurs facteurs sont importants pour la mise en place de l'innervation dans la pulpe, tels que les Sémaphorine 7A et NGF qui participent également à la différenciation des odontoblastes (Mitsiadis et coll., 1992 ; Maurin et coll., 2005). Nous avons cherché à détecter les Sémaphorines dans les réassociations CE/CM après implantation, suite à une difficulté technique nous n'avons pas obtenu d'immunomarquages satisfaisants. Alors que, les odontoblastes se différencient tout à fait normalement dans les réassociations aussi bien sur le plan cytologique que fonctionnel (Hu et coll., 2005 a,b), l'innervation de notre modèle d'ingénierie dentaire semble ne pas être possible sans l'apport de facteurs neurotrophiques exogènes. Par ailleurs les travaux de Maurin et coll, (2005) ont montré que la transfection des cellules COS (lignée transformée de cellules rénales de singes) à l'aide d'un vecteur contenant le gène codant pour la Sémaphorine 7A d'origine odontoblastique, permet la poussée des axones de TG vers les cellules transfectées mises en co-culture *in vitro*. Ces résultats suggèrent que la Sémaphorine 7A, d'origine odontoblastique, pourrait être une des molécules agissant sur les fibres nerveuses pulpaire pour permettre leur arrivée au sein de la couche odontoblastique. L'utilisation de cette technique pour nos cellules mésenchymateuses avant réassociation, pourrait permettre l'innervation de nos explants.





### **IV.3. FORMATION DES COURONNES DENTAIRES AU COURS DU DEVELOPPEMENT ET D'INGENIERIE TISSULAIRE**

Hormis la vascularisation et l'innervation, d'autres paramètres essentiels sont à prendre en compte pour notre stratégie d'ingénierie dentaire à savoir : a) l'acquisition de la morphologie de la couronne dentaire indispensable pour sa fonctionnalité, et b) l'identification de ressources cellulaires non dentaires capables de se différencier en odontoblastes et améloblastes.

#### **a) Acquisition de la morphologie de la couronne dentaire**

Au cours de l'odontogénèse, lors de la transition bourgeon-capuchon dentaire il y a apparition du nœud de l'émail primaire (NEP) (Pispa et coll., 1999; Tucker et Sharpe, 2004 ; Lesot et Brook, 2009). Cette structure histologique transitoire, considérée comme un centre de signalisation (Jernvall et coll., 1994 ; Vaahtokari et coll., 1996), est localisée au sommet de la dépression du capuchon dentaire et est constituée de cellules qui ne prolifèrent plus et de cellules apoptotiques (Nozue, 1971 a,b ; Jernvall et coll., 1994 ; Lesot et coll., 1996 ; Coin et coll., 1999). Sa fonction est étroitement liée aux interactions épithélio-mésenchymateuses, elle est responsable de la morphogénèse, par le contrôle de la mise en place du patron cuspidien et possède des caractéristiques différentes dans les incisives et les molaires. Le NEP d'incisive ne présente aucune activité apoptotique et disparaît par un réarrangement histologique. Dans les dents multicuspidées, le NEP disparaît par apoptose quelques heures après sa formation. La transition NEP/NES (noeuds de l'émail secondaires) résulte de la ségrégation des cellules du NEP (Coin et coll., 1999). Les NES sont localisés aux endroits de formation des cuspidés (Lisi et coll., 2003 ; Obara et Lesot, 2007). Dans le cas de l'incisive l'existence possible d'une transition NEP-NES, n'a pas pu être abordée expérimentalement, la question reste ouverte. Pour savoir si les propriétés du NEP, spécifique d'une classe de dent, sont conditionnées par le mésenchyme, nous avons réalisé des réassociations hétérotopiques (Nait Lechguer et coll., 2009). Deux types de réassociations entre tissus dentaires des germes

de molaires et d'incisives E14 ont été étudiés. Des réassociations entre mésenchymes de molaire (MesM) et épithéliums d'incisives (EpI), et également entre mésenchymes d'incisives (MesI) et épithéliums de molaire (EpM). Les réassociations ont été cultivées pendant 3 jours pour examiner le NEP et de 6 à 8 jours pour examiner la forme finale des couronnes (Nait Lechguer et coll., 2009).

Des cellules dérivées de la moelle osseuse, réassociées à un épithélium dentaire permettent d'obtenir des dents avec la différenciation d'odontoblastes et d'améloblastes fonctionnels (Ohazama et coll., 2004 ; Hu et coll., 2006 b). Cependant, la morphologie de la couronne n'est pas satisfaisante alors qu'elle conditionne la fonctionnalité dentaire. Les expériences de Kollar et Baird (1969, 1970) avaient montré que le mésenchyme contrôle la morphogénèse dentaire. Plus récemment, il a été démontré que les caractéristiques cellulaires du NEP sont différentes selon le type dentaire (Coin et coll., 1999 ; Kieffer et coll., 2001). Au stade de capuchon, l'apoptose intervient dans l'élimination des cellules internes du NEP des germes de molaire, ce qui n'est pas le cas pour les germes d'incisive. Par des expériences de dissociations/réassociations hétérotopiques entre épithélium et mésenchyme d'incisive et molaire au stade capuchon et en prenant l'apoptose du NEP comme marqueur fonctionnel, nous avons montré que dans les réassociations MesM/EpI cultivées pendant 3 jours, l'apoptose a été détectée dans le NEP alors qu'au début de la culture, il n'y avait pas d'apoptose dans l'épithélium des incisives. Des NEPs étaient également présents dans les réassociations MesI/EpM cultivées pendant 3 jours, mais aucun corps apoptotique n'a été observé. Nos résultats montrent donc que le mésenchyme de molaire induit l'apparition d'apoptoses dans le NEP de l'épithélium incisive et inversement, le mésenchyme d'incisive inhibe l'apoptose dans le NEP de l'épithélium molaire. Après 6 et 8 jours de culture *in vitro*, les réassociations MesM/EpI développent des couronnes de type molaire avec plusieurs cuspides et les réassociations MesI/EpM développent des dents de type incisive (Nait Lechguer et coll., 2009).

En conclusion, le mésenchyme spécifie les caractéristiques du NEP qui se forme dans ces réassociations. Cela peut expliquer le rôle du mésenchyme dans la spécification morphogénèse coronaire (Kollar et Baird, 1969 ; Nait Lechguer et coll., 2009).

## **b) Recherche d'une ressource cellulaire non dentaire**

Dans la dent adulte, les odontoblastes qui sécrètent la prédentine/dentine sont des cellules postmitotiques avec des possibilités de remplacement très limitées (Smith et Lesot, 2001) et les améloblastes, qui sécrètent l'émail, disparaissent peu avant l'éruption. La plupart des travaux d'ingénierie dentaire font appel à des cellules embryonnaires dentaires. L'ingénierie tissulaire dentaire nécessite l'emploi de cellules facilement disponibles. La moelle osseuse contenant des cellules multipotentes semble représenter une alternative intéressante au mésenchyme dentaire (Ohazama et coll., 2004 ; Modino et Sharpe, 2005). La moelle osseuse comporte des cellules souches hématopoïétiques susceptibles de se différencier en cellules de peau, de poumon, de foie et le système gastro-intestinal (Grove et coll., 2004). Ohazama et coll., 2004 ont utilisé ces cellules pour les réassocier à un épithélium oral prélevé au stade 10 jours. Après implantation de ces réassociations dans la capsule rénale ils ont obtenu dans 10% des cas des dents avec différenciations des odontoblastes et des améloblastes fonctionnels et l'histogénèse de l'organe de l'émail. Toutefois ces auteurs ne sont pas parvenus à obtenir des dents multicuspidées. Le patron cuspidien étant sous contrôle du NEP, nous avons cherché à savoir si ces cellules pouvaient permettre l'induction ou le maintien de ce centre de signalisation.

Pour tenter de comprendre cette absence de cuspides, nous avons remplacé le mésenchyme molaire par les cellules de la moelle osseuse (BMC), pour analyser leur capacité à se différencier en cellules dentaires et à fonctionnaliser le NEP initialement présent dans l'épithélium E14. Pour cela, nous avons prélevé et cultivé des cellules de la moelle osseuse comme décrit par Ohazama et coll., (2004). Ces cellules ont été réassociées avec un épithélium dentaire du jour 14 dont nous savons qu'il est compétent (Hu et coll., 2005 a,b). Les réassociations entre épithélium molaire et cellules dérivées de la moelle osseuse ont été cultivées jusqu'à 6 jours. Les dents qui se développent à partir de ces réassociations, montrent une histogénèse épithéliale comprenant l'ensemble des compartiments (EDI, EDE, SI, SR), sauf le NEP. Les couronnes obtenues ne présentent pas de cuspide. Cela pourrait s'expliquer par l'incapacité des cellules de la moelle osseuse à stocker les molécules de signalisation d'origine épithéliales (provenant du NEP), ou par l'incapacité des cellules de la moelle à

maintenir la fonctionnalité du NEP initialement présent dans l'épithélium à E14 utilisé pour ces réassociations (Nait Lechguer et coll., 2009).



# Crown Formation During Tooth Development and Tissue Engineering

ADNANE NAIT LECHGUER<sup>1,2</sup>, SABINE KUCHLER-BOPP<sup>1,2</sup>, AND HERVE LESOT<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>INSERM UMR 595 Faculte de medecine, 11, rue Humann Strasbourg, France

<sup>2</sup>Faculty of Dentistry, Louis Pasteur University, Strasbourg Cedex, France

**ABSTRACT** Considering tooth crown engineering, three main parameters have to be taken into account: (1) the relationship between crown morphology and tooth functionality, (2) the growth of the organ, which is hardly compatible with the use of preformed scaffolds, and (3) the need for easily available nondental competent cell sources. In vitro reassociation experiments using either dental tissues or bone marrow-derived cells (BMDC) have been designed to get information about the mechanisms to be preserved in order to allow crown engineering. As the primary enamel knot (PEK) is involved in signaling crown morphogenesis, the formation and fate of this structure was investigated (1) in heterotopic reassociations between embryonic day 14 (ED14) incisor and molar enamel organs and mesenchymes, and (2) in reassociations between ED14 molar enamel organs and BMDC. A PEK formed in cultured heterotopic dental tissue reassociations. The mesenchyme controls the fate of the EK cells, incisor or molar-specific using apoptosis as criterion, and functionality to drive single/multiple cusps tooth development. Although previous investigations showed that they might differentiate as odontoblast- or ameloblast-like cells, BMDC reassociated to an enamel organ could not support the development of multicusp teeth. These cells apparently could neither maintain nor stimulate the formation of a PEK. *J. Exp. Zool. (Mol. Dev. Evol.)* 312B, 2009. © 2009 Wiley-Liss, Inc.

---

**How to cite this article:** Nait Lechguer A, Kuchler-Bopp S, Lesot H. 2009. Crown formation during tooth development and tissue engineering. *J. Exp. Zool. (Mol. Dev. Evol.)* 312B:[page range].

---

Several complementary approaches are being developed to try to engineer entire tooth or parts of it, which may either involve the use of scaffolds or attempts to mimic tooth development (Young et al., '05; Mao et al., '06; Sumita et al., '06; Honda et al., '07; Nakao et al., '07; Yen and Sharpe, '08). Tooth crown morphogenesis involves epithelial histogenesis, cusps development and cell differentiation. All these steps could be achieved when culturing reassociations between epithelial/mesenchymal cells–tissue or even cells–cells from Embryonic Day 14 (ED14) molar (Hu et al., '05a, '05b). Although cell position in the epithelial compartment was lost, epithelial histogenesis was rapidly restored. In cultured cell–cell reassociations, crown morphogenesis appeared more difficult to achieve, which led to the development of single cusp teeth. However, they were different from incisors as they did not show any labial–lingual asymmetry. The specificity for tooth class, which is determined by the mesenchyme, was thus

preserved. Furthermore, by increasing the number of mesenchymal cells reassociated with an epithelium, it was possible to increase the proportion of multicusp teeth (Hu et al., '06a).

These experiments may bring information about the mechanisms, which have to be preserved in order to allow crown engineering. However, tooth tissue engineering requires the use of easily available nondental cell sources (Gronthos et al., '06; Yen and Sharpe, '06). Recent works have shown that bone marrow-derived cells (BMDC) can be used instead of a dental mesenchyme and even lead to odontoblast differentiation (Ohazama

---

Grant sponsor: INSERM; Grant sponsor: Louis Pasteur University; Grant sponsor: COST Action B23.

\*Correspondence to: Hervé Lesot, INSERM U595, Faculty of Medicine, 11, rue Humann, 67085 Strasbourg Cedex, France. E-mail: Herve.Lesot@odonto-ulp.u-strasbg.fr

Received 13 November 2008; Accepted 14 November 2008  
Published online in Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com). DOI: 10.1002/jez.b.21256

et al., '04). Similarly, they could give rise to ameloblast-like cells when reassociated with a dental mesenchyme (Hu et al., '06b). However, tooth functionality depends on crown morphology. The progressive gradients of odontoblasts and ameloblasts differentiation must be preserved in order to allow an adjustment of hard, mineralized, matrix deposition to the growing epithelial-mesenchymal junction (EMJ). This represents a major constraint for the engineering of multicusp teeth. To use nondental cell resources, it will be necessary to find methods in order to respect the morphology of the epithelial-mesenchymal junction, before cell differentiation. This means that primary and secondary enamel knots must form and their fate must be correctly controlled in space. To address and restrict this broad question, attempts were made (1) to make heterotopic reassociations between incisor- and molar-derived tissues in order to determine whether the mesenchyme does control the fate of primary enamel knot (PEK) cells, and (2) to analyze the situation when BMDC are reassociated with a dental epithelium. The induction, maintenance and fate of the PEK were investigated *in vitro*.

## MATERIALS AND METHODS

### *Embryos*

ICR female mice were mated overnight, and the detection of the vaginal plug was considered as ED0. The embryos were harvested at ED14, and the incisors and first molars were isolated from the lower jaw under a stereomicroscope (Leica MZ9.5 Leica Microsystemes SA, Rueil-Malmaison, France).

### *Tooth tissue dissociation, reassociations and culture*

The dental epithelium and mesenchyme were dissociated by the use of 1% trypsin in Hanks' buffer at 4°C for 30 min (Schmitt et al., '99). The absence of contamination of any tissue by the other was checked from histological sections, as previously published (Hu et al., '05a). Heterotopic reassociations between isolated epithelia and mesenchymes from incisors and molars were cultured for 3–8 days on 2 mL of semi-solid medium per Petri dish (Corning, VWR, Fontenay Sous Bois, France). The medium consisted of DMEM/F12 (Gibco, Invitrogen, Cergy Pontoise, France) supplemented with ascorbic acid (0.18 mg/mL, Merck Sharp & Dohme-Chibret, Paris,

France), L-Glutamin (2 mM, Gibco), fetal bovine serum (FBS 20%, Invitrogen SARL, Cergy Pontoise, France), penicillin/streptomycin (50 units/mL, Gibco) and agar (0.36%, Sigma, Saint-Quentin Fallavier, France). The reassociations were incubated and grown at 37°C in a humidified atmosphere of 5% CO<sub>2</sub> in air and the medium was changed every 2 days.

### *Preparation and culture of bone marrow cells (BMC)*

Tibiae and femora were collected from adult (6–9 weeks old) ICR mice. After sectioning the bone diaphysis, the cavity was flushed out with minimal essential medium (MEM) culture medium. BMC were collected and suspended in MEM (Gibco) containing 20% FBS, penicillin/streptomycin (50 units/mL, Gibco). BMC were cultured for 10 days in a 75 cm<sup>2</sup> tissue flask; the medium was changed after 3 days and then every 2 days. All these steps were performed according to the protocol described by Ohazama et al. ('04).

### *Reassociations of dental epithelia with BMDC*

After 10 days *in vitro*, BMDC were detached from the culture flask by trypsin (0.05%)–EDTA (0.53 mM) (Gibco) treatment for 5 min at 37°C. Trypsin was blocked by 20% FBS in MEM. Cells were collected by centrifugation at 400g for 5 min. For reassociations, a large excess of BMDC ( $11.6 \pm 0.1 \times 10^6$ ) were deposited on the semi-solid culture medium and an intact ED14 enamel organ was applied on the BMDC. For some experiments, attempts were made to embed the reassociations in Matrigel (BD Biosciences, Le Pont de Claix, France). The reassociations were grown up to 8 days at 37°C as described above.

### *Histology*

Teeth and reassociations were fixed in Bouin–Hollande solution and embedded in paraffin. Five µm serial sections were stained with Mallory's solution.

## RESULTS

### *Heterotopic reassociations between molar/incisor mesenchyme and epithelium*

As previously shown by Kollar and Baird ('69, '70a, '70b), the shape of a tooth developing from cultured heterotopic reassociations depends on the origin of the mesenchyme. As the shape of a tooth

is controlled by the PEK, which has different characteristics in the incisor and molar, attempts were made to see whether the mesenchyme might influence the fate of PEK cells. Cultures of

heterotopic reassociations between the epithelium and mesenchyme from incisor and molar were used as a model system to test this point (Fig. 1).

First lower molars (Fig. 2A) and lower incisors (Fig. 2D) were obtained from ED14 mouse embryos. After trypsin-treatment, the mesenchymes were manually separated from the epithelia (Fig. 2B and E). Before reassociation, the morphology of the epithelium was also checked to ensure a correct staging (compare Fig. 2B and C or Fig. 2E and F). At ED14, the first lower molar has reached the cap stage (Fig. 2B and C) and the epithelium of the R2 element (Peterkova et al., '03) had already engaged in the formation of the first molar proper as can be seen from the elevated portion of the cervical loop mesially (Fig. 2B and C). Using tissues from this stage for the reassociations then allowed avoiding problems possibly linked to this complex formation of the anterior part of the molar.

Both in the incisor and molar, the PEK becomes visible at the early cap stage. However, the fate of PEK cells is tooth-specific. In the molar, apoptosis mediates the elimination of the internal cells of the PEK (Fig. 3A, arrows), mainly at ED15 in the

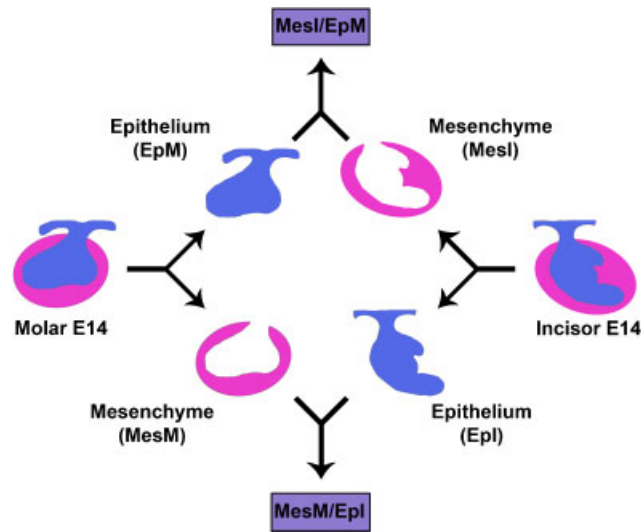


Fig. 1. Scheme of the dissociation-reassociation experiments performed with dental tissues from ED14 tooth germs.

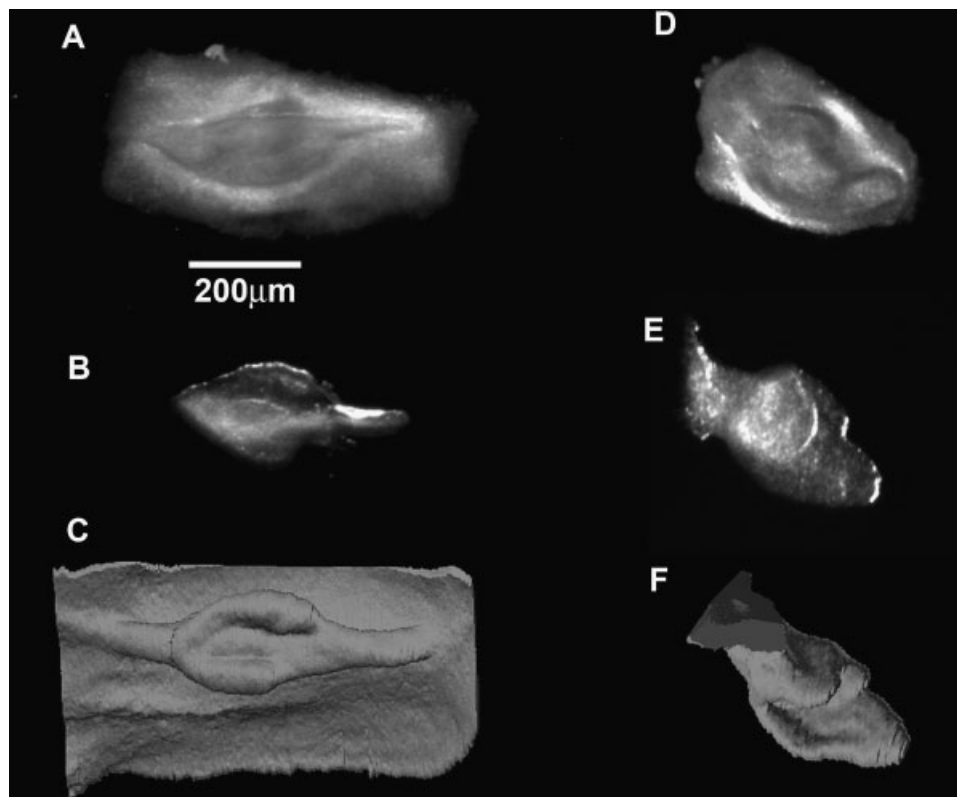


Fig. 2. ED14 embryonic mouse molar (A) and incisor (D) have been dissociated by trypsin-treatment. The epithelium (B, E) was isolated and used for further reassociations (see Fig. 1). The developmental stage and absence of contamination of the isolated enamel organs (B, E) can be visualized by comparison with computer aided reconstructions of molar (C) and incisor (F) enamel organ according to Lisi et al. ('03) and Kieffer-Combeau et al. ('01).



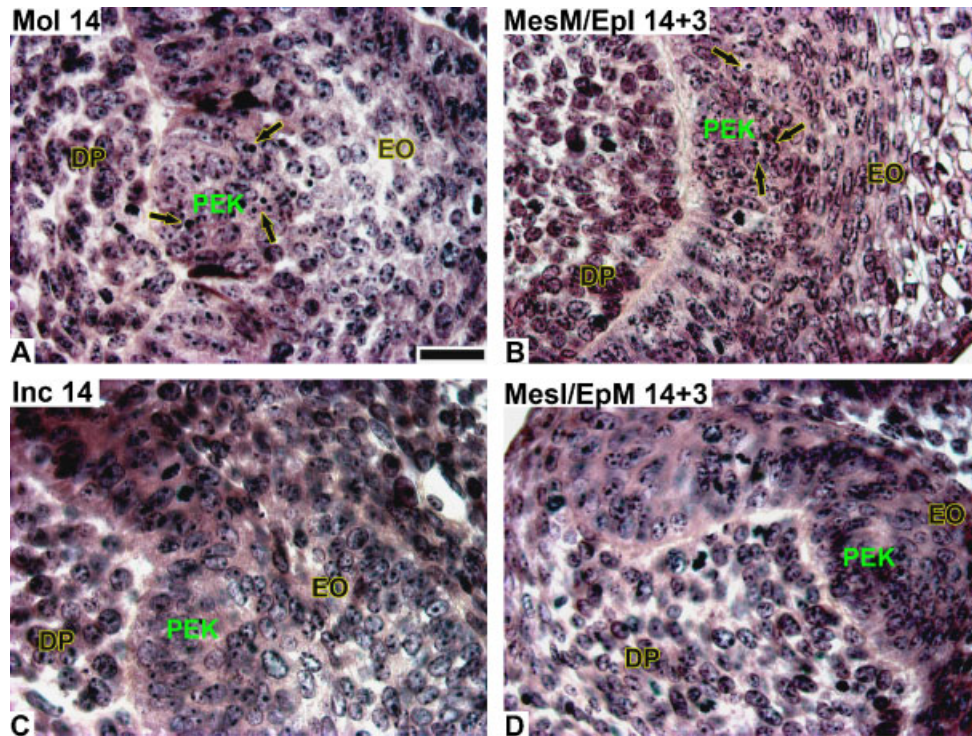


Fig. 3. Histological sections of an ED14 first lower molar (A), incisor (C) and cultured reassociations between molar mesenchyme and incisor epithelium (MesM/EpI) (B) and incisor mesenchyme and molar epithelium (MesI/EpM) (D). In all cases a primary enamel knot (PEK) was visible, which showed apoptotic bodies (arrows) only in case of the molar (A) and MesM/EpI reassociations (B). Abbreviations are as follows: DP, dental papilla; EO, enamel organ; PEK, primary enamel knot. Bar = 40  $\mu$ m.

first lower molar. At this stage, PEK cells in contact with the basement membrane survive and segregate (Coin et al., '99; Shigemura et al., '99; Lisi et al., '03; Obara was Lesot, '07). In the incisor, no apoptosis was detected in the PEK (Fig. 3C) and a cellular reorganization was suggested to mediate the disappearance of the enamel knot (Kieffer-Combeau et al., '01).

Heterotopic reassociations were performed between the mesenchyme of molar (MesM) and the epithelium of incisor (EpI) and also between the mesenchyme of incisor (MesI) and the epithelium of molar (EpM). They were grown for 3 days to look at the PEK (Fig. 3) and from 6–8 days to look for the final shape of developing teeth (Fig. 4).

When MesM/EpI reassociations were cultured for 3 days, apoptosis were detected in the PEK (Fig. 3B, arrows). As at the onset of the culture, there was no apoptosis in the epithelium of the incisor (Fig. 3C), what was observed in the reassociation had been induced by the mesenchyme.

A PEK was also present in MesI/EpM reassociations cultured for 3 days but no apoptotic bodies were observed in this structure (Fig. 3D). This fits with the absence of apoptosis in the PEK of the

incisor (Fig. 3C) and suggests that the apoptotic process, which had already started in the molar epithelium (Fig. 3A), was inhibited in the reassociation.

After 8 days in vitro, reassociations of MesM/EpI gave rise to molar-type teeth with several cusps forming (Fig. 4A and C). Secondary enamel knots (SEK) were present at the tip of developing cusps (Fig. 4A). After 6 days in vitro, MesI/EpM reassociations gave rise to incisors with a single cusp and an asymmetrical development of the crown- and root-analogues (Fig. 4D and F). In both cases, a characteristic dental epithelial histogenesis was observed and odontoblasts became functional (Fig. 4B, C, E, F).

### ***Reassociations between BMDC and a dental epithelium***

BMDC were prepared and cultured exactly as described by Ohazama et al. ('04) and reassociated with a molar epithelium from the cap stage (Fig. 5A). The purpose was to investigate whether in these conditions cusp would form and whether this would lead to single or multicusp teeth. It was

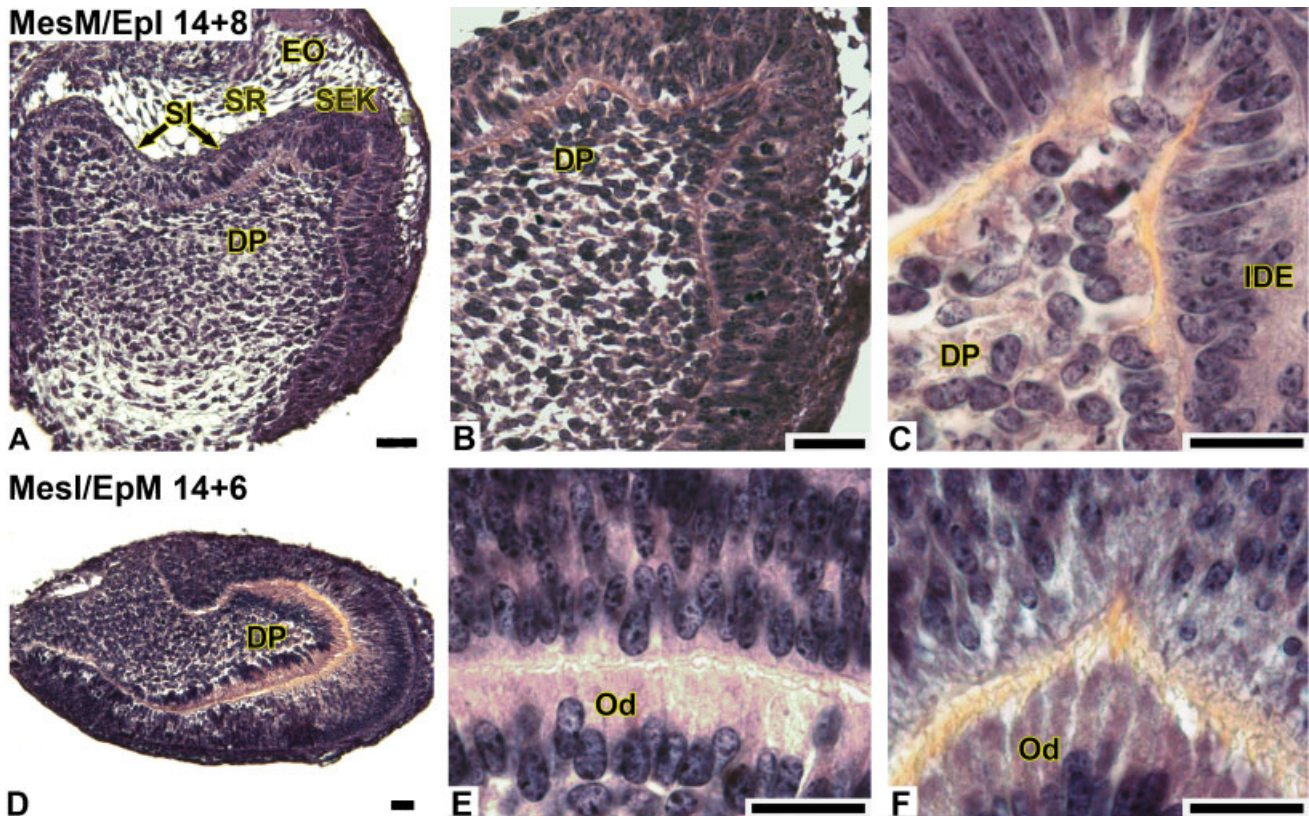


Fig. 4. Histological sections of reassociations between molar mesenchyme and incisor epithelium (MesM/EpI) cultured for 8 days (A, B, C) and between incisor mesenchyme and molar epithelium (MesI/EpM) cultured for 6 days (D, E, F). Abbreviations are as followed: DP, dental papilla; EO, enamel organ; IDE, inner dental epithelium; Od, odontoblast; SEK, secondary enamel knot; SI, stratum intermedium; SR, stellate reticulum. Bars = 40  $\mu$ m.

known from previous work that at this stage the dental epithelium may respond to the mesenchyme, although first the reassociation moves back to the bud stage (Hu et al., '05a, '05b). This means that the PEK, which was initially present, was not maintained but disappeared and formed again.

When an ED14 dental epithelium was cultured on pelleted crude BMC, these cells rapidly dispersed on the semi-solid culture medium and the reassociation could not be maintained (Hu et al., '06b). To try to stabilize the reassociations and avoid such a cell spreading, attempts were made to embed the reassociations in Matrigel. However, no change was observed. Thus, a large excess of BMC was used at the initial stage of the culture so that their number would not become a limiting parameter with time (Fig. 5B). In these conditions, teeth developed in about 10% cases (2/18), but a molar shape with several cusps could not be achieved after 6 or 8 days in vitro (Fig. 5D and E). Ohazama et al. ('04) obtained similar yield when analyzing teeth that developed after implantation of the reassociations in the kidney

capsule. The formation or maintenance of a PEK could not be observed when an ED14 enamel organ was reassociated with BMC and cultured for 3 days.

## DISCUSSION

The two sets of cultured heterotopic reassociations between dental tissues showed that, depending on its origin, the dental mesenchyme can stimulate or inhibit apoptosis in the epithelial compartment. This suggests (1) that apoptosis in the PEK is controlled by the mesenchyme and (2) that incisor PEK cells as well as those from the molar have the receptors to respond to the mesenchymal signal. It has been suspected that P21, *msx-2*, and BMP-4 might participate in the regulation of apoptosis in the PEK during molar development (Jernvall et al., '98). However, possible qualitative or quantitative differences in the expression/localization of these molecules in the PEK of molar vs. incisor have not been investigated. As FGF-4, may have an opposite

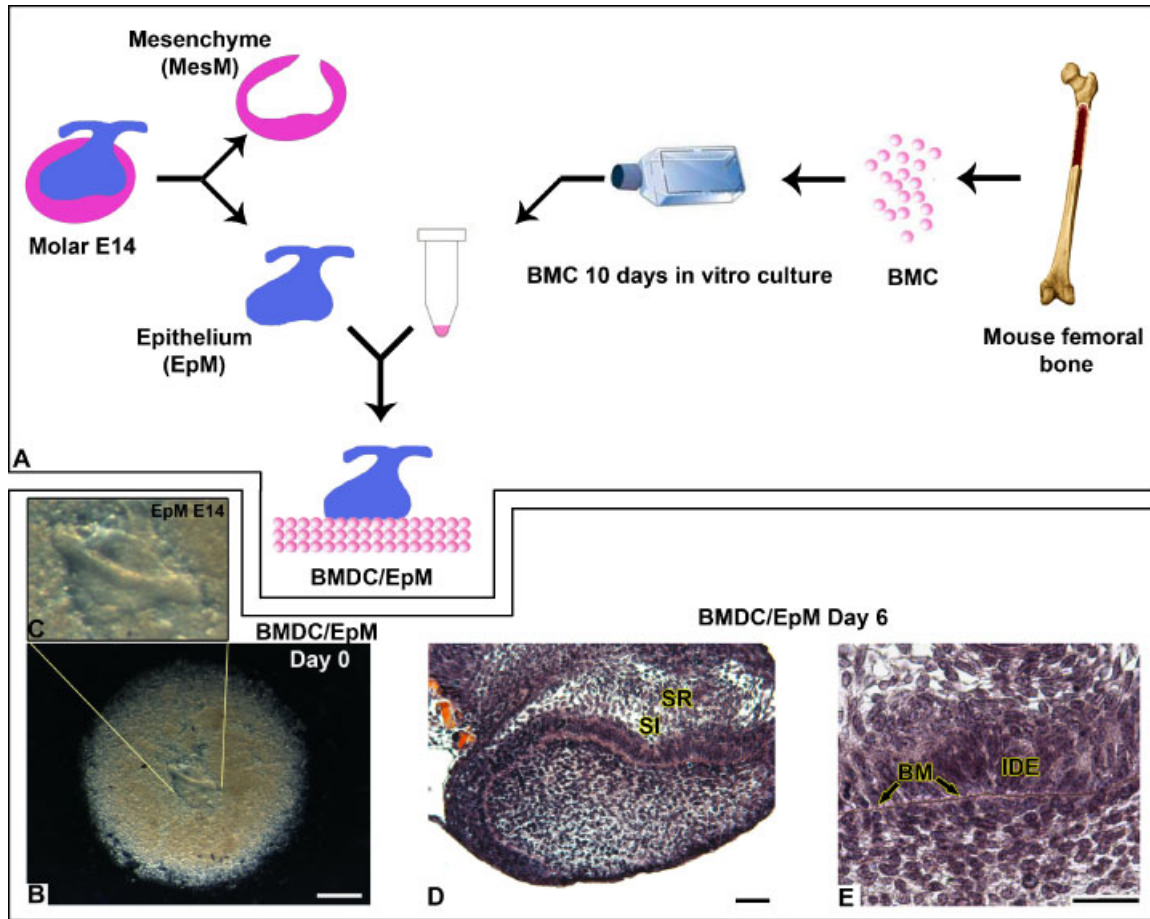


Fig. 5. Reassociations between a cap stage (ED14) enamel organ (EpM) and bone marrow-derived cells (BMDC). (A) Experimental protocol as described in the Material and Methods. (B) An enamel organ from a molar (EpM) at the cap stage, see magnification in (C), is deposited on a large excess of BMDC and cultured for 6 days. (D,E) Histological sections of the reassociations after 6 days in vitro show the histogenesis of the enamel organ. The epithelial mesenchymal junction, including the basement membrane (BM) is restored (E) but cusps do not form (D). Abbreviations are as followed: BM, basement membrane; IDE, inner dental epithelium; SI, stratum intermedium; SR, stellate reticulum. Bar = 500  $\mu$ m in B, 25  $\mu$ m in D and E.

effect and suppress apoptosis in the dental epithelium (Vaahtokari et al., '96), the localization of this molecule and its receptors would have to be compared in the two types of teeth when the PEK is disappearing. Such a role of epithelial–mesenchymal interactions in the control of epithelial apoptosis has been illustrated in the case of mammary gland remodeling (Lund et al., '96) and hair follicle development (Botchkareva et al., '06). Constituents of the basement membrane and thus the composition of this matrix might be involved in the control of apoptosis, and the adhesion of cells to the extracellular matrix via integrins is involved in cell survival (Green and Streuli, '04; Farrelly et al., '99). This possibility, in case of PEK cells in the molar has previously been discussed (Lesot et al., '99) and the immunostaining for laminin-5 showed differences in the

composition of the basement membrane associated with the PEK from the molar and incisor (Yoshida et al., '00). However, it is not known whether these two sets of data may be causally related. The lack of reliable antibodies to laminin-5 does not allow testing this hypothesis by comparing the composition of the basement membrane in the different heterotopic reassociations.

The presence of several cusps in MesM/EpI reassociations cultured for 8 days showed that several secondary enamel knots can form from the PEK of an incisor enamel organ. Coin et al. ('99) have suggested that in the molar, the formation of several secondary enamel knots resulted from the segregation of the nondividing PEK cells in contact with the basement membrane, which might result from the intercalation of dividing cells. At the late cap stage during molar develop-

ment, BrdU-positive cells were detected in the inner dental epithelium, precisely when the second secondary enamel knot individualized at E15.5 (Coin et al., '99; Obara and Lesot, '07). The observation that several secondary enamel knots can form in cultured MesM/EpI reassociations would then suggest (1) that the pattern of mitosis in the incisor epithelium is altered and (2) that this is controlled by the molar mesenchyme. Besides the patterning of cell division itself, which is essential during organogenesis, the orientation and positioning of the cell division plane also has to be specified. It has been shown in *C. Elegans* early development and in *Drosophila*, during pupae development or during nervous system differentiation, that WNT signaling was involved in the orientation of the mitotic spindle (Salinas, '07). In all these examples, WNT signaling was suggested to act on microtubules, and more precisely on microtubules tethering to the cell cortex in *Drosophila*. Recent investigations by imaging in situ, using mouse small intestine crypt as a model, showed a tight control of planar spindle orientation (Fleming et al., '07). It is not clear yet how this is specified in space, but adherens junctions, junctional complexes and cortical forces generators were suspected to play a role (Bienz, '01; Perez-Moreno et al., '03; They et al., '07). If indeed the intercalation of dividing cells is involved in the segregation of nondividing cells of the PEK, this activity has to be specified in space and time in order to fit with cusp forming and positioning, which is tooth-specific.

Making reassociations from embryonic dental cells allows designing a strategy to be used for tooth tissue engineering, but of course not to directly engage in engineering. For this purpose other more easily available cell sources have to be searched for and tested (Yen and Sharpe, '06). BMDC, when used to replace the dental mesenchyme, can give rise to tooth development ending up with the differentiation of functional odontoblast-like cells inducing the differentiation of ameloblasts (Ohazama et al., '04). However, the problem of cusp formation and possible limitations in this, as observed with dental mesenchymal cells (Hu et al., '06b) also has to be solved. To address this point and continue with the work described in heterotopic reassociations, we raised the question of the ability of BMDC to induce the formation of a PEK and to control its fate.

In this work, no cusp differentiated after 6 days in vitro and the presence of a PEK could not be found at earlier stage. For these experiments,

enamel organs from ED14 were used, instead of ED10 oral epithelia, in the work by Ohazama et al., ('04). However, the absence of PEK in this experimental approach should not be related to the stage of the epithelium. Indeed, epithelial cells obtained from the dissociation of ED14 enamel organs, when reassociated with a dental mesenchyme or dental mesenchymal cells can be induced to form a new PEK in vitro (Hu et al., '05a, '05b). Looking at the evolution of the reassociations between dental cells in vitro, one could see that at early stage of the culture, the epithelium first appeared as a bud-like structure and a PEK could be detected only after 3 days (Hu et al., '05a, '05b). Thus, despite the developmental regression in cultured reassociations, the ED14 enamel organ used in these experiments is competent to form a PEK if it is induced to do so. The limiting parameter here seems to be related to the BMDC, which either cannot bring or cannot store the necessary signaling molecules. Previous experiments have shown that the morphogenesis was much better achieved when dental epithelial cells were reassociated with an intact dental mesenchyme instead of dissociated dental mesenchymal cells. However, further experiments showed that increasing the number of mesenchymal cells to be reassociated with an intact epithelium improved the quality of the morphogenesis (i.e. the number of cusps that developed). This suggested that increasing the number of mesenchymal cells might increase the level of signaling toward the epithelial compartment (Hu et al., '06a).

When using BMDC, the amount of signaling molecules might not be sufficient or their storage may be limited so that they diffuse in the culture medium. The same has been observed in another situation, when attempts have been made to induce odontoblast differentiation by using growth factors. These molecules were tested for their ability to replace the inner dental epithelium. In these conditions, functional odontoblast differentiation was obtained only when the active diffusible molecules (TGF $\beta$ s or BMPs) were immobilized using heparin (Bègue-Kirn et al., '92). A similar approach could be performed to try to improve the potentialities of BMDC. Bone marrow stromal cells indeed express several heparan sulfate proteoglycans including glypican-1, syndecan-3 and -4 at their surface, and perlecan has been detected in the ECM (Schofield et al., '99). However, it is not known whether this was retained after the 10 days culture period, which

preceded their culture in contact with a molar enamel organ.

## CONCLUSION

Tooth functionality depends on crown morphology. The shape of the EMJ will determine the position and orientation of functional odontoblasts and later ameloblasts. This junction thus has to be preserved in order to allow the final shaping of the mineralized crown. A major constraint for tooth tissue engineering is linked to the growth of the organ, which is hardly compatible with the use of scaffolds to direct morphology. A PEK formed in cultured heterotopic dental tissue reassociations. The mesenchyme controls the fate of the EK cells to drive single/multiple cusps tooth development. By allowing the differentiation of odontoblasts (Ohazama et al., '04) or ameloblasts (Hu et al., '06b), BMDC obviously represent an attractive cell resource for tooth engineering. Their use to replace the mesenchyme indeed allows the development of teeth (Ohazama et al., '04). However, a correct morphology of the epithelial–mesenchymal junction could not be achieved, probably owing to the impossibility for these cells to maintain or induce the formation of a PEK.

## ACKNOWLEDGMENTS

We thank Hervé Gegout for excellent technical assistance with histology.

## LITERATURE CITED

- Bègue-Kirn C, Smith AJ, Ruch JV, Wozney JM, Purchio A, Hartmann D, Lesot H. 1992. Effects of dentin proteins, transforming growth factor beta 1 (TGF beta 1) and bone morphogenetic protein 2 (BMP2) on the differentiation of odontoblast in vitro. *Int J Dev Biol* 36:491–503.
- Bienz M. 2001. Spindles cotton on to junctions, APC and EB1. *Nat Cell Biol* 3:67–68.
- Botchkareva NV, Ahluwalia G, Shander D. 2006. Apoptosis in the hair follicle. *J Invest Dermatol* 126:258–264.
- 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.
- Farrelly N, Lee YJ, Oliver J, Dive C, Streuli CH. 1999. Extracellular matrix regulates apoptosis in mammary epithelium through a control on insulin signaling. *J Cell Biol* 144:1337–1348.
- Fleming ES, Zajac M, Moschenross DM, Montrose DC, Rosenberg DW, Cowan AE, Tirnauer JS. 2007. Planar spindle orientation and asymmetric cytokinesis in the mouse small intestine. *J Histochem Cytochem* 55:1173–1180.
- Green KA, Streuli CH. 2004. Apoptosis regulation in the mammary gland. *Cell Mol Life Sci* 61:1867–1883.
- Gronthos S, Akintoye SO, Wang CY, Shi S. 2006. Bone marrow stromal stem cells for tissue engineering. *Periodontology* 2000 41:188–195.
- Honda MJ, Shinohara Y, Hata KI, Ueda M. 2007. Subcultured odontogenic epithelial cells in combination with dental mesenchymal cells produce enamel-dentin-like complex structures. *Cell Transplant* 16:833–847.
- Hu B, Nadiri A, Bopp-Kuchler S, Perrin-Schmitt F, Lesot H. 2005a. Dental epithelial histomorphogenesis in vitro. *J Dent Res* 84:521–525.
- Hu B, Nadiri A, Bopp-Kuchler S, Perrin-Schmitt F, Wang S, Lesot H. 2005b. 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.
- Hu B, Uda F, Bopp-Kuchler S, Jimenez L, Wang XJ, Haikel Y, Wang SL, Lesot H. 2006b. Bone marrow cells can give rise to ameloblast-like cells. *J Dent Res* 85:416–421.
- 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.
- Kieffer-Combeau S, Meyer JM, Lesot H. 2001. Cell–matrix interactions and cell–cell junctions during epithelial histomorphogenesis in the developing mouse incisor. *Int J Dev Biol* 45:733–742.
- 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. 1970a. Tissue interactions in embryonic mouse tooth germs. I. Reorganization of the dental epithelium during tooth-germ reconstruction. *J Embryol Exp Morphol* 24:159–171.
- Kollar EJ, Baird GR. 1970b. Tissue interactions in embryonic mouse tooth germs. II. The inductive role of the dental papilla. *J Embryol Exp Morphol* 24:173–186.
- Lesot H, Peterková R, Schmitt R, Meyer JM, Viriot L, Vonesch JL, Senger B, Peterka M, Ruch JV. 1999. Initial features of the inner dental epithelium histomorphogenesis in the first lower molar in mouse. *Int J Dev Biol* 43:245–254.
- Lisi S, Peterkova R, Peterka M, Vonesch JL, Ruch JV, Lesot H. 2003. Tooth morphogenesis and pattern of odontoblast differentiation. *Connect Tissue Res* 44:167–170.
- Lund LR, Rømer J, Thomasset N, Solberg H, Pyke C, Bissell MJ, Danø K, Werb Z. 1996. Two distinct phases of apoptosis in mammary gland involution: proteinase-independent and -dependent pathways. *Development* 122:181–193.
- Mao JJ, Giannobile WV, Helms JA, Hollister SJ, Krebsbach PH, Longaker MT, Shi S. 2006. Craniofacial tissue engineering by stem cells. *J Dent Res* 85:966–979.
- Nakao K, Morita R, Saji Y, Ishida K, Tomita Y, Ogawa M, Saitoh M, Tomooka Y, Tsuji T. 2007. The development of a bioengineered organ germ method. *Nat Methods* 4:227–230.
- Obara N, Lesot H. 2007. Asymmetrical growth, differential cell proliferation and dynamic cell rearrangement underlie epithelial morphogenesis in the mouse molar development. *Cell Tissue Res* 330:461–473.

- Ohazama A, Modino SA, Miletich I, Sharpe PT. 2004. Stem-cell-based tissue engineering of murine teeth. *J Dent Res* 83:518–522.
- Perez-Moreno M, Jamora C, Fuchs E. 2003. Sticky business: orchestrating cellular signals at adherens junctions. *Cell* 112:535–548.
- Peterkova R, Peterka M, Lesot H. 2003. The developing mouse dentition: a new tool for apoptosis study. *Ann N Y Acad Sci* 1010:453–466.
- Salinas PC. 2007. Modulation of the microtubule cytoskeleton: a role for a divergent canonical Wnt pathway. *Trends Cell Biol* 17:333–342.
- Schmitt R, Lesot H, Vonesch JL, Ruch JV. 1999. Mouse odontogenesis in vitro: the cap-stage mesenchyme controls individual molar crown morphogenesis. *Int J Dev Biol* 43:255–260.
- Schofield KP, Gallagher JT, David G. 1999. Expression of proteoglycan core proteins in human bone marrow stroma. *Biochem J* 343:663–668.
- Shigemura N, Kiyoshima T, Kobayashi I, Matsuo K, Yamaza H, Akamine A, Sakai H. 1999. The distribution of BrdU- and TUNEL-positive cells during odontogenesis in mouse lower first molars. *Histochem J* 31:367–377.
- Sumita Y, Honda MJ, Ohara T, Tsuchiya S, Sagara H, Kagami H, Ueda M. 2006. Performance of collagen sponge as a 3-D scaffold for tooth-tissue engineering. *Biomaterials* 27:3238–3248.
- Thery M, Jimenez-Dalmaroni A, Racine V, Bornens M., Julicher F. 2007. Experimental and theoretical study of mitotic spindle orientation. *Nature* 447:493–496.
- Vaahokari A, Aberg T, Thesleff I. 1996. Apoptosis in the developing tooth: association with an embryonic signaling center and suppression by EGF and FGF-4. *Development* 122:121–129.
- Yen AH, Sharpe PT. 2006. Regeneration of teeth using stem cell-based tissue engineering. *Expert Opin Biol Ther* 6:9–16.
- Yen AH, Sharpe PT. 2008. Stem cells and tooth tissue engineering. *Cell Tissue Res* 331:359–372.
- Yoshihara K, Yoshihara N, Aberdam D, Meneguzzi G, Perrin-Schmitt F, Stoetzel C, Ruch JV, Lesot H. 2000. Differential expression of laminin-5 subunits during incisor and molar development in the mouse. *Int J Dev Biol* 44:337–340.
- Young CS, Abukawa H, Asrican R, Ravens M, Troulis MJ, Kaban LB, Vacanti JP, Yelick PC. 2005. Tissue-engineered hybrid tooth and bone. *Tissue Eng* 11:1599–1610.



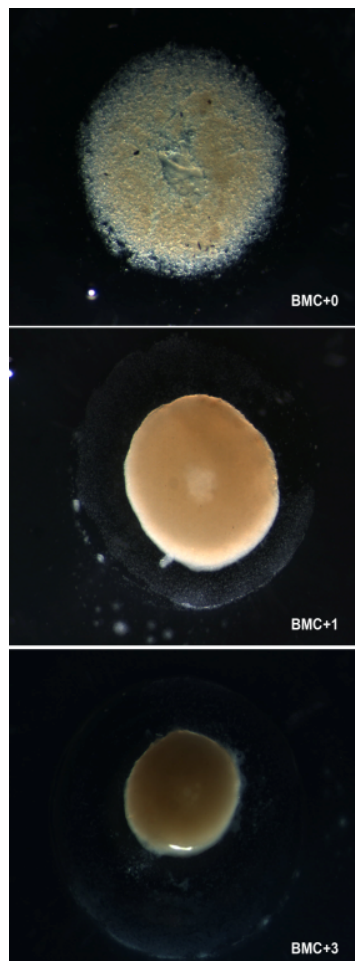
### c) Résultats complémentaires

La moelle osseuse étant composée de nombreux types de cellules souches hématopoïétiques et mésenchymateuses (Grove et coll., 2004), deux sous-populations de cellules souches hématopoïétiques ont été décrites, c-kit + et c-kit - (Matthews et coll., 1991). Elles ont été séparées sur ce critère pour être testées pour leur capacité à se différencier en améloblastes (Hu et coll., 2006 b). Des cellules de la fraction c-kit + ont été mélangées avec des cellules épithéliales dentaires, puis cultivées avec un mésenchyme dentaire ou des cellules mésenchymateuses. Dans ces deux cas, les cellules c-kit + s'insèrent très bien dans l'épithélium qui se reforme dans les réassociations. Un suivi par marquage à la GFP a montré que les cellules c-kit + situées au contact de la MB peuvent se différencier en améloblastes : changement de forme, sortie du cycle cellulaire, expression de gènes codant pour l'amélogénine et l'améloblastine, et sécrétion polarisée d'amélogénine et de MMP 20, deux marqueurs de la formation de l'émail. Ce phénotype ne s'observe que pour les cellules c-kit+ présentes dans l'EDI (Hu et coll., 2006 b). L'absence de MB pendant les premières heures de culture des réassociations permet aux cellules c-kit + de migrer dans le mésenchyme. Dans ce compartiment, et lorsqu'elles sont en contact avec la MB, les cellules de la fraction c-kit + se différencient en odontoblastes (Hu et coll., 2006 b). Ces résultats n'ayant pu être reproduits avec la fraction c-kit -, il faut admettre qu'il existe des différences entre les deux populations, soit dans leur capacité à s'intégrer aux tissus dentaires, soit à y survivre. Il est possible que ces différences entre c-kit + et c-kit - s'appliquent aussi à leur capacité à induire la morphogenèse dentaire.

Nous avons examiné si les cellules c-kit + remplaçant le mésenchyme dentaire n'offraient pas de meilleures performances à induire ou maintenir le nœud de l'émail primaire. Nous avons séparé les deux populations cellulaires de la moelle en utilisant une technique de billes magnétiques couplées à un anticorps dirigé contre les c-kit (le système MACS, Miltenyi biotech. Paris, France). La qualité de séparation a été vérifiée par le système FACS en collaboration avec le Docteur J. Barths (Institut de Virologie, Strasbourg), ce test a montré que les cellules c-kit + étaient pures à 99,4%, alors que les c-kit - étaient contaminées par des c-kit + et d'autres types cellulaires. Les c-kit + représentent 5% de la totalité des cellules de la moelle.

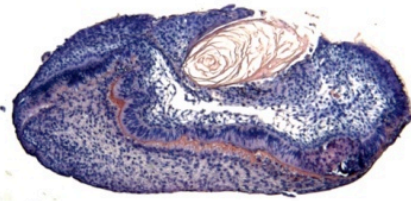


Nous avons réassocié des cellules des fractions c-kit + ou c-kit - avec des épithéliums de molaires E14 et comme témoins nous avons utilisé les cellules de la moelle sans séparation préalable (BMC) cultivées préalablement ou non pendant 10 jours (Fig. 16). Les réassociations ont été cultivées pendant 10 jours. Dans les réassociations avec les sous populations des cellules de la moelle, les c-kit + et c-kit - peuvent se différencier en cellules dentaires, avec différenciation fonctionnelle des odontoblastes (Fig. 17, A-D). Les couronnes obtenues ne présentent pas de cuspidés. Aucune différence n'a été observée entre les c-kit + et c-kit - et les BMC préalablement cultivées (Fig. 17 A-E). Lorsque les BMC sont réassociées sans culture préalable, le stade de différenciation des cellules est moins avancé (Fig. 17, G).

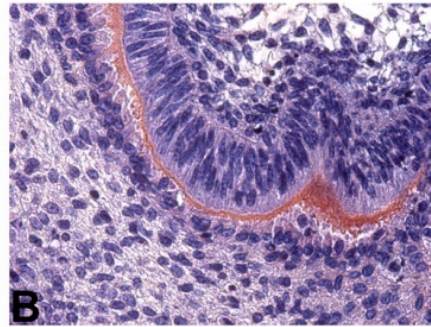


**Figure 16** : Image macro des réassociations entre Ep 14 et BMC à j-0 après 1 et 3 jours de culture.

**BMC C-Kit-/Ep14 + 10**

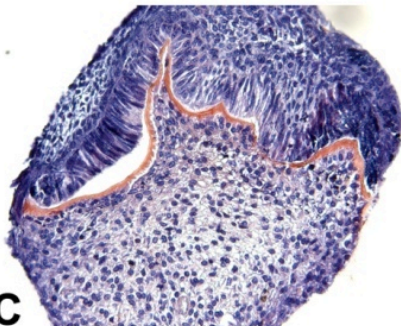


**A**

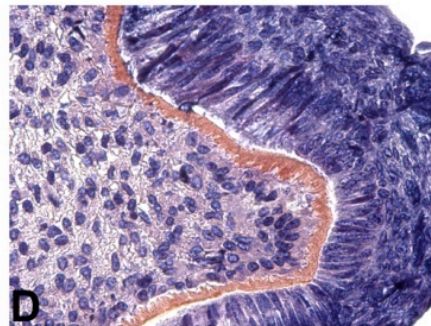


**B**

**BMC C-Kit+/Ep14 + 10**

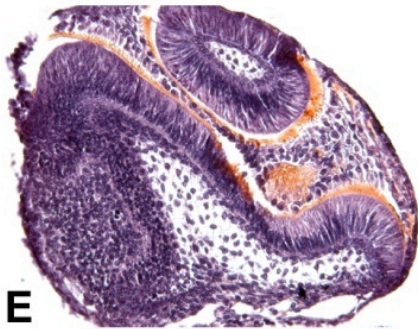


**C**



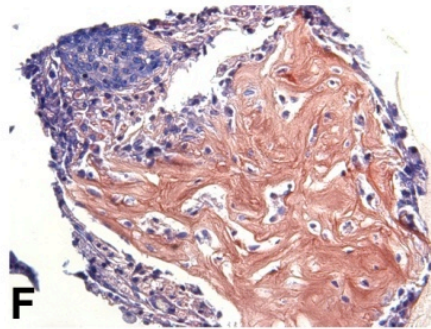
**D**

**BMC+10/Ep14 + 10**



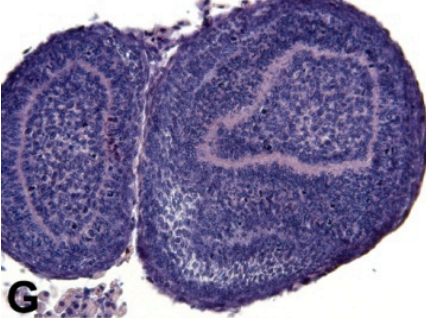
**E**

**BMC+Heparine/Ep14 + 10**



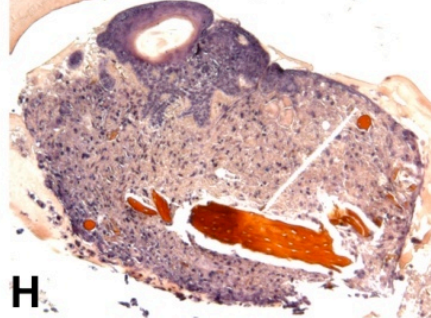
**F**

**BMC/Ep14 + 10**



**G**

**BMC/Ep14/matrigel + 10**



**H**

**Figure 17 : culture des réassociations entre Ep 14 et BMC**

Une étude de l'induction expérimentale de la différenciation d'odontoblastes par des facteurs de croissance avait montré la nécessité de stabiliser certains facteurs par de l'héparine notamment la BMP-2 et le TGF-beta 1 pour en éviter leur diffusion (Bègue-Kirn et coll., 1992). Pour tester cette hypothèse, nous avons cultivé les réassociations d'épithélium dentaire E14 avec les cellules de la moelle préalablement incubées pendant 10 min avec de l'héparine (0,1 µg/ml du milieu de culture, Sigma). Après 10 jours de culture, nous avons observé que dans ces conditions les cellules de la moelle se différencient en cellules osseuses (Fig. 17 F). D'autre part, nous avons recouvert les réassociations avec du matrigel (BD, Biosciences), qui contient des facteurs de croissance et d'adhésion (Nguyen et coll., 1992). De plus, l'effet gel permet de minimiser la fuite cellulaire observée après 3 jours de culture (Fig. 16). Après 10 jours de culture, les cellules de la moelle se différencient également en cellules osseuses (Fig. 17 H).

Ces premières données montrent que les réassociations entre c-kit + ou c-kit - avec un épithélium dentaire compétent ne permettent pas d'obtenir une morphologie coronaire ni la formation ou le maintien d'un NEP. Le paramètre limitant semble être lié aux capacités des cellules de la moelle à sécréter ou stocker les molécules de signalisation indispensables à ce stade de formation. Ainsi elles semblent dépourvues de propriétés spécifiques dentaires des cellules mésenchymateuses. Il a été montré que la qualité de la morphogenèse (nombre des cuspides) était fonction du nombre de cellules mésenchymateuses associées à un épithélium dentaire intact (Hu et coll., 2005 a,b). Cela suggère que le niveau de signalisation, lié au nombre de cellules, est un paramètre critique. D'autres études seront donc nécessaires pour élucider les aspects moléculaires en prenant en compte la localisation et la quantité des molécules de signalisation indispensables au fonctionnement du NEP et celle de composants matriciels pouvant jouer un rôle de réservoir.

## **V. DISCUSSION ET CONCLUSION GENERALES**

Le XXIème siècle sera sans doute celui de la médecine régénérative et de l'ingénierie tissulaire. Plusieurs domaines ont déjà adopté ces techniques et elles sont utilisées couramment comme option thérapeutique de choix. Le plus ancien traitement utilisant des cellules souches est la transplantation de moelle osseuse. Il est utilisé depuis les années 1970 (Fouillard et coll., 2003, 2007). La peau ou la greffe de "peau artificielle" obtenue par la multiplication en culture de cellules souches épidermiques est également largement pratiquée (Lataillade et coll., 2007). Et enfin, plusieurs autres domaines émergents sont déjà aux étapes des applications cliniques chez l'homme : le remplacement de certains muscles cardiaques nécrosés (Katritsis et coll., 2005), la reconstruction osseuse (Haynesworth et coll., 1992), le remplacement des cellules nerveuses dans certaines maladies dégénératives (Maladies de Parkinson ou de Huntington) (Bachoud-Levi et coll., 2000), la greffes de pancréas ou de cellules sécrétrices d'insuline dans de certains types de diabète (Shapiro et coll., 2000), etc...

Il est indispensable que l'odontologie profite de toutes ces avancées biotechnologiques. Jusqu'à présent la recherche en odontologie se limite aux études des alliages, leur résistance mécanique, l'adhésion aux tissus dentaires, ou encore le pouvoir de désinfection des produits utilisés pour les traitements des affections dentaires etc... De nouvelles voies de recherches doivent permettre de modifier la perception de ce domaine de la médecine dont l'image est souvent réduite, à une profession « d'arracheur de dent » ou encore de « remplisseur de trous ». La dentisterie moderne devra très prochainement prendre conscience que son avenir est dans la biologie.

Des travaux d'ingénierie tissulaire dentaire sont actuellement développées dans le monde entier : en Europe (Ohazama et coll., 2004; Hu et coll., 2006a; 2006b ; Nait Lechguer et coll., 2008, 2009), en Asie (Honda et coll., 2005 ; Ikeda et coll., 2009) et aux Etats-Unis (Young et coll., 2002 ; Duailibi et coll., 2008). Des approches complémentaires sont développées dans plusieurs laboratoires pour reconstituer des dents. L'objectif commun de tous ces travaux est de parfaire la science de "l'ingénierie tissulaire guidée de l'organe dentaire entier".

La technique de scaffolds est largement utilisée en ingénierie tissulaire. En ingénierie dentaire, cette technique se heurte à la nécessité d'une morphogenèse et d'une croissance progressive qui seules permettent la mise en place des gradients de différenciation.

Initialement, les travaux de recherche de notre équipe visaient à déterminer si le mésenchyme dentaire est aussi capable de contrôler l'histogenèse épithéliale, pour ensuite tester le rôle du nœud de l'émail primaire dans la spécification du mésenchyme et évaluer le rôle possible d'informations de position au niveau des cellules de l'épithélium dentaire. Ce travail s'est orienté vers l'ingénierie tissulaire. Ainsi, un ensemble d'approches expérimentales et une stratégie globale visant à obtenir, à partir de réassociations tissu/cellules ou cellules/cellules, la formation d'une dent entière (couronne, racine et parodonte) (Hu et coll., 2006 a). Enfin, l'absence de cellules dentaires embryonnaire chez l'adulte, nous a amené rechercher des sources cellulaires non-dentaires (Hu et coll., 2006 b ; Nait Lechguer et coll., 2009).

L'ingénierie tissulaire de la dent doit répondre à certains critères, qui sont : le respect de la morphologie coronaire, l'obtention d'une minéralisation correcte, la qualité de l'interface dentine-émail, le développement des racines, et l'obtention du périodonte permettant l'ancrage de la dent à l'os alvéolaire, la vascularisation, l'innervation et enfin trouver des sources cellulaires, capables de se différencier en tissus dentaires.

La réassociation directe entre cellules épithéliales et mésenchymateuses permet la restauration d'une interface épithélio-mésenchymateuse proche de celle existant au cours du développement physiologique. Ce protocole permet : la mise en place d'un système dynamique où les deux compartiments évoluent de façon conjointe et coordonnée ; un agencement cellulaire correct, quel que soit le compartiment considéré. Ainsi l'histomorphogenèse coronaire peut être reproduite *in vitro*. Toutefois, les réassociations réalisées avec un mésenchyme intact donnent de meilleurs résultats que celles réalisées avec

des cellules mésenchymateuses dissociées (Hu et coll. 2005 b). Le nombre de cuspides obtenues est lié au nombre de cellules mésenchymateuses utilisées (Hu et coll., 2006 a). Le niveau de signalisation, lié au nombre de récepteurs de basse affinité présents dans le mésenchyme, pourrait donc être un facteur influençant la morphogénèse coronaire.

L'implantation de ces réassociations en sous-cutané ou dans la mâchoire chez des souris adultes a permis d'obtenir le développement de racines, du système d'ancrage et d'os. De plus, dans la couronne, on retrouve une dentine tubulaire. La densité des tubules est conforme à ce que l'on observe *ex vivo* au même stade. A côté de cette dentine tubulaire, la présence de cristaux d'émail bien formés montre que les différents aspects de la minéralisation sont correctement reproduits. La cinétique de la mise en place de la vascularisation a également été déterminée ainsi que son origine. La mise en place de l'innervation dans nos réassociation a été impossible. Néanmoins, on a pu déterminer sa cinétique en *ex vivo* ainsi que les facteurs limitant l'entrée des fibres nerveuses dans les réassociations.

Dans la dent adulte, les odontoblastes sont des cellules postmitotiques avec des possibilités de remplacement limitées (Smith et Lesot, 2001) et les améloblastes, disparaissent peu avant l'éruption. La plupart des travaux d'ingénierie dentaire font appel à des cellules embryonnaires dentaires. La moelle osseuse semble représenter une alternative intéressante au mésenchyme dentaire (Ohazama et coll., 2004 ; Modino et Sharpe, 2005).

Ohazama et coll., (2004) avaient montré que les cellules de la moelle osseuse réassociées avec un épithélium compétent, permettaient de remplacer les cellules du mésenchyme dentaire. Toutefois, la morphologie de la couronne n'était pas satisfaisante (absence de cuspides). Le développement des cuspides étant contrôlé par le nœud de l'émail primaire, nous avons cherché à savoir si les cellules de la moelle pouvaient induire la formation de ce centre de signalisation, ou au moins le maintenir dans un état fonctionnel.

Les dents qui se développent à partir de ces réassociations, montrent la différenciation d'odontoblastes fonctionnels et une histogenèse épithéliale comprenant l'ensemble des compartiments, sauf le nœud de l'émail primaire. Cela explique l'absence de formation de cuspides. Les ressources cellulaires non dentaires, notamment les BMC présentent une incapacité à induire la morphogenèse coronaire. La recherche de techniques pour rendre ces cellules compétentes s'avère indispensable. Par ailleurs, tester d'autres cellules souches pourrait être également une voie à expérimenter.

Aujourd'hui, on peut considérer qu'il est possible de produire une dent complète si l'on raisonne en termes d'histologie ou de cytodifférenciation fonctionnelle, c'est-à-dire de fabrication d'émail, de dentine, de parodonte. Pour autant, nous ne savons pas contrôler ni la taille ou la forme des explants. De plus cela n'est actuellement possible qu'à partir de cellules embryonnaires dentaires ou souches animales (Ouhazama et coll., 2004 ; Hu et coll, 2005 a,b , 2006 a,b ; Nait Lechguer et coll., 2008, 2009). Il reste très prématuré d'espérer remplacer des dents perdues par des dents fabriquées *in vitro*. Plusieurs autres aspects sont à élucider et un travail considérable reste à réaliser pour optimiser la fonctionnalité d'une « Bioengineered tooth » :

- a) Eclaircir les aspects génétiques et moléculaires impliqués dans l'initiation du développement dentaire, ainsi que, dans les étapes clés de l'histomorphogenèse dentaire.
- b) Trouver d'autres ressources cellulaires non dentaires compétentes pour remplacer l'épithélium et le mésenchyme dentaire et capables d'acquérir des potentialités odontogéniques.

L'ensemble de ces approches facilitera le développement de thérapies pertinentes pour induire la formation des dents naturelles et le remplacement des dents perdues.



## **VI ANNEXES**



## CROWN FORMATION DURING TOOTH DEVELOPMENT AND TISSUE ENGINEERING.

[A. Nait-Lechguer](#)<sup>1,2</sup>, [S. Kuchler-Bopp](#)<sup>1,2</sup>, [B. Hu](#)<sup>1,2</sup> and [H. Lesot](#)<sup>1,2</sup>.

1) *INSERM U595, 67085 Strasbourg, France*; 2) *Faculty of Dentistry, Louis Pasteur University, 67085 Strasbourg Cedex, France.*

**INTRODUCTION:** Tooth crown morphogenesis involves epithelial histogenesis, cusps development and cell differentiation. All these steps were achieved when E14 molar epithelial/mesenchymal cell-tissue or even cell-cell reassociations were grown in vitro (1). Although cell position in the epithelial compartment was lost, epithelial histogenesis was rapidly restored. In cultured cell-cell reassociations, crown morphogenesis appeared more difficult to achieve. This raised the question of the control of primary and secondary enamel knots formation and fate. To address and restrict this broad question, attempts were made 1) to determine whether the mesenchyme can control the fate of PEK cells, by using heterotopic reassociations, and 2) to analyze the situation when BMC are reassociated with a dental epithelium (2).

**METHODS:** Histology and immunostaining have been performed on tooth germs, cultured heterotopic reassociations between dental epithelia from molars or incisors with converse mesenchymes, and reassociations between molar epithelium and bone marrow cells (BMC) (2). Dental tissues were obtained by trypsin dissociations of mouse tooth germs from ED14 and ED13. BMC were prepared and cultured according the protocol of Ohazama et al., (2). Immunostainings for cadherin and ssDNA were performed as described previously (3).

**RESULTS:** In heterotopic tissue reassociations between molar and incisor tissues, the formation and fate of a primary enamel knot was compared to what was observed when culturing intact teeth. As expected, the reassociations, the fate of the PEK is directed of the mesenchyme with a complex pattern of segregation of the non-dividing IDE cells of the PEK when controlled by a molar mesenchyme. Tooth tissue engineering requires the use of non-dental cell sources. When reassociating a ED14 molar epithelium with BMC cells instead of a dental mesenchyme, teeth developed but a molar shape with several cusps could not be achieved.

**DISCUSSION & CONCLUSIONS:** Tooth functionality depends on crown morphology. Not only the shape of the epithelial-mesenchymal junction (EMJ), but also the progressive gradients of odontoblasts and ameloblasts differentiation, must be preserved in order to allow the final shaping of the mineralized crown. A major constraint for tooth tissue engineering is linked to the growth of the organ, which is hardly compatible with the use of scaffolds to direct morphology. A PEK formed in cultured heterotopic dental tissue reassociations. The mesenchyme controls the fate of the EK cells to drive single/multiple cusps tooth development. By allowing the differentiation of odontoblasts (2) or ameloblasts (4), BMC obviously represent an attractive cell resource for tooth engineering. Their use to replace the mesenchyme indeed allows the development of teeth. However, a correct morphology could not be achieved. In enamel organ/dental papillae cells reassociations, the number of mesenchymal cells appeared to be a critical parameter. Similar reassociations with a very large excess of BMC did not improve the results, suggesting a limitation in crude BMC, possibly linked to their ability to store signaling molecules.

**REFERENCES:** <sup>1</sup> Hu B, Nadiri A, Bopp-Kuchler S, Perrin-Schmitt F and Lesot H. (2005) Dental Epithelial Histomorphogenesis in vitro. *J Dent Res.*, **84** :521-525. <sup>2</sup> Ohazama A, Modino SA, Miletich I and Sharpe PT., (2004), Stem-cell-based tissue engineering of murine teeth. *J Dent Res.*, **83** :518-522. <sup>3</sup> Obara N and Lesot H (2004) Subcellular localization of beta-catenin and cadherin expression in the cap-stage enamel organ of the mouse molar. *Histochem Cell Biol.* **121** :351-358. <sup>4</sup> Hu B, Unda F, Bopp-Kuchler S, Jimenez L, Wang XJ, Haikel Y, Wang SL, and Lesot H., (2006), Bone marrow cells can give rise to ameloblast-like cells. *J Dent Res.*, 2006, **85**, 416-421.

**ACKNOWLEDGEMENTS:** This work was supported by the INSERM, Louis Pasteur University and COST Action B23.



# EXPRESSION DE WNT10b ET WNT5a AU COURS DE L'HISTOMORPHOGENESE DENTAIRE

## WNT10b AND WNT5a EXPRESSION IN DENTAL HISTO-MORPHOGENESIS

Sabine KUCHLER-BOPP  
Adnane NAIT LECHGUER  
Hervé LESOT

INSERM, U595,  
67000 Strasbourg, France

Origine des crédits :  
INSERM, ULP, IFRO

Le développement dentaire est contrôlé par des interactions épithélio-mésenchymateuses faisant intervenir quatre grandes familles de molécules de signalisation : BMP, FGF, Hh et WNT. Sachant que les WNTs stimulent de nombreux événements cellulaires tels que l'adhésion et la prolifération, nous nous sommes intéressés à la localisation de WNT10b, WNT5a et de leur récepteur Frizzled (Fz) à différents stades du développement dentaire et dans des réassociations entre cellules épithéliales et cellules mésenchymateuses. Cette étude montre qu'il existe une distribution spécifiquement épithéliale de WNT10b au cours du développement dentaire. Au stade de capuchon, la protéine WNT10b est présente principalement dans l'épithélium dentaire externe (EDE) et absente du nœud de l'émail primaire (NEP). Au stade de cloche, WNT10b est toujours localisée dans l'EDE et également dans la zone de jonction entre l'EDE et l'épithélium dentaire interne (EDI) appelée lèvre cervicale. WNT5a n'a pas cette distribution épithéliale unique puisqu'on la trouve également dans le mésenchyme puis la pulpe dentaire et la couche odontoblastique. Le récepteur Fz quand à lui est présent dans tout le germe dentaire : épithélium et mésenchyme.

Dans les réassociations entre cellules épithéliales et cellules mésenchymateuses de notre modèle de dent *in vitro*, on observe un marquage semblable pour Fz à celui détecté dans les germes dentaires. Par contre, en plus de la localisation épithéliale WNT10b est présente dans le mésenchyme péri-dentaire et WNT5a est surtout présente dans le mésenchyme dentaire et péri-dentaire. Cette étude d'immunolocalisation des WNTs et de Fz, montrant une distribution spatio-temporelle de ces molécules, nous permet de proposer un rôle de ces WNTs dans la prolifération et la différenciation des cellules épithéliales dans la dent.

FRIZZLED  
HISTOGENESE EPITHELIALE  
INTERACTIONS EPITHELIO-MESENCHYMATEUSES  
ODONTOGENESE  
WNT

*Tooth development is controlled by epithelio-mesenchymal interactions implicating four families of signaling molecules: BMP, FGF, Hh and WNT. WNTs are known to stimulate a lot of cellular events like adhesion and proliferation. That is why we have taken a particular interest in the cellular localization of WNT10b, WNT5a and Frizzled (Fz), the WNT receptor, during tooth development and also in epithelial cells/mesenchymal cells reassociations. We have observed that at the cap stage WNT10b is specific for epithelial cells particularly cells of the external dental epithelium (EDE). In contrast WNT10b is absent from the primary enamel knot (PEK). At the bell stage, WNT10b is always present in the EDE and also in the junction area between EDE and IDE corresponding to the cervical loop where the mitotic activity is high. WNT5a is not only present in the epithelium but also in the mesenchyme and later in the dental pulp and in the odontoblasts. Fz receptor is present in both the epithelium and the mesenchyme. In the reassociations between epithelial cells and mesenchymal cells corresponding to our tooth model in vitro, the immunostaining for Fz is the same as in the lower molars at the cap stage. We can observe WNT10b in the epithelium and also in the peridental mesenchyme and WNT5a is essentially present in the dental and peridental mesenchymes. Finally the immunolocalization of WNTs and the Fz receptor is in accordance with a role in the proliferation and differentiation of epithelial cells in the tooth.*

FRIZZLED  
EPITHELIAL HISTOGENESIS  
EPITHELIAL-MESENCHYMAL INTERACTIONS  
ODONTOGENESIS  
WNT

## INTRODUCTION

Le développement dentaire est contrôlé par des interactions épithélio-mésenchymateuses faisant intervenir quatre grandes familles de molécules de signalisation : BMP, FGF, Hh et WNT. Les WNTs constituent une famille de molécules de signalisation impliquées dans le contrôle du développement. Ce sont des glycoprotéines riches en cystéine. L'être humain possède 19 gènes *Wnt* alors que la souris n'en possède que 18 (Miller, 2001). Les WNTs stimulent des activités cellulaires différentes : prolifération, migration et polarisation cellulaire. Beaucoup de WNTs sont essentiels pendant l'embryogenèse mais sont aussi actifs dans la régénération des tissus adultes comme la peau, les follicules pileux et l'os (Alonso et Fuchs, 2003). Les Wnts activent trois voies différentes : la voie *Wnt/β-caténine*, la voie *Wnt/Ca<sup>2+</sup>* et le mécanisme du contrôle de la polarisation cellulaire (Huelsken et Birchmeier, 2001 ; Miller 2001). La voie *Wnt/β-caténine*, également connue sous le nom de "voie canonique" intervient dans le contrôle de la prolifération et de la survie cellulaire. La voie *Wnt/Ca<sup>2+</sup>* augmente le niveau du calcium intracellulaire et l'activation de la PKC (Clevers, 2006) alors que la voie *Wnt/polarisation cellulaire* active plusieurs protéines modulant l'organisation du cytosquelette (Habas et coll., 2003). Les WNTs se lient à des récepteurs membranaires au nombre de 10 chez l'homme et 9 chez la souris, connus sous le nom de *Frizzled* (Fz). Peu de données existent sur la spécificité et l'affinité WNT/ligand, mais il doit exister des redondances puisqu'il y a deux fois plus de Wnts que de Fzs (Bhanot et coll., 1996). Les gènes Wnts sont exprimés au cours du développement dentaire de la souris avec des distributions spatio-temporelles spécifiques. Plusieurs membres de cette famille participeraient aux interactions épithélio-mésenchymateuses pendant l'odontogenèse (Dassule et McMahon, 1998 ; Sarkar et Sharpe, 1999).

L'histomorphogenèse épithéliale nécessite certaines molécules de signalisation telles que les WNTs qui stimulent l'adhésion, la prolifération et interagissent avec d'autres facteurs de croissance

de la famille des FGFs (Kratochwill et coll., 2002) et des BMPs (Chen et coll., 2006). Nous avons étudié la localisation de WNT10b, WNT5a et de leur récepteur *Frizzled* (Fz) à différents stades du développement dentaire et dans des réassociations entre cellules épithéliales et cellules mésenchymateuses qui est notre modèle de dent *in vitro* (Hu et coll., 2005a et b). Nous avons choisi WNT10b et WNT5a parce que les gènes correspondants sont exprimés par différents types de cellules du germe dentaire au cours du développement : *wnt 10b* est exprimé dans le nœud de l'émail au stade du capuchon puis dans l'épithélium dentaire interne au stade de la cloche. *wnt 5a* est exprimé dans le mésenchyme et plus tard dans la pulpe dentaire (Sarkar et Sharpe, 1999).

## I. MATÉRIEL ET MÉTHODES

### 1.1. IMMUNOHISTOCHEMIE

Nous utilisons les souris de la souche ICR et considérons comme jour 0 de la gestation, le jour de mise en évidence du bouchon vaginal. La congélation des têtes de souris à E14, E16 et E18 se fait dans du 2-méthylbutane préalablement refroidi dans de la carboglace. Les têtes sont conservées à -20°C.

Des coupes frontales de 7µm, réalisées avec un cryostat, sont récupérées sur des lames recouvertes de polylysine. Elles sont alors fixées avec de l'acétone pendant 10 min à 4°C. Après trois lavages de 10 min avec du PBS, les coupes sont saturées avec la BSA à 1% dans le PBS pendant 1 h puis incubées toute la nuit à 4°C dans une chambre humide avec les différents anticorps primaires : anti-

WNT5a (sc-23698, dilution 1/100, Santa-Cruz CA), anti-WNT10b (sc-7432, dilution 1/150, Santa Cruz, CA) et anti-Frizzled (sc-9169, dilution 1/150, Santa-Cruz, CA). Après trois lavages de 10 min avec le PBS, les coupes sont incubées pendant 2 h à température ambiante et en chambre humide avec les anticorps secondaires : anti-goat-Alexa-488 (dilution 1/200, Molecular Probes) utilisé pour révéler les WNTs et anti-rabbit-Alexa-594 (dilution 1/200, Molecular Probes) pour la révélation de Fz. Puis les coupes sont lavées trois fois 10 min avec le PBS et ensuite incubées pendant 1 min avec le 4',6-diamidino-2-phenyl-indole, dihydrochloride ou DAPI (Invitrogen, Molecular Probes, Eugene USA) à 1% dans le PBS. Le montage des lames est réalisé avec du milieu de montage Permafluor (Dako) et les coupes sont observées avec un microscope à fluorescence équipé d'un système d'acquisition d'images.

### 1.2. DISSOCIATIONS CELLULAIRES ET CULTURES

Après prélèvement des germes des premières molaires inférieures chez des embryons de 14 jours, le tissu épithélial et le tissu mésenchymateux sont dissociés après un traitement à la trypsine (Difco) à 1% dans du Hanks' à 4°C pendant 30 min. Après séparation des deux tissus, l'épithélium et le mésenchyme sont dissociés mécaniquement en cellules et centrifugés. Des fragments du culot des deux types cellulaires sont ensuite réassociés et mis en culture. Les réassociations sont cultivées pendant 4 jours sur milieu semi-solide dans une étuve à CO<sub>2</sub> (5%) en atmosphère humide. Le milieu est changé tous les 2 jours. Le milieu utilisé est du DMEM/F-12 (Invitrogen)

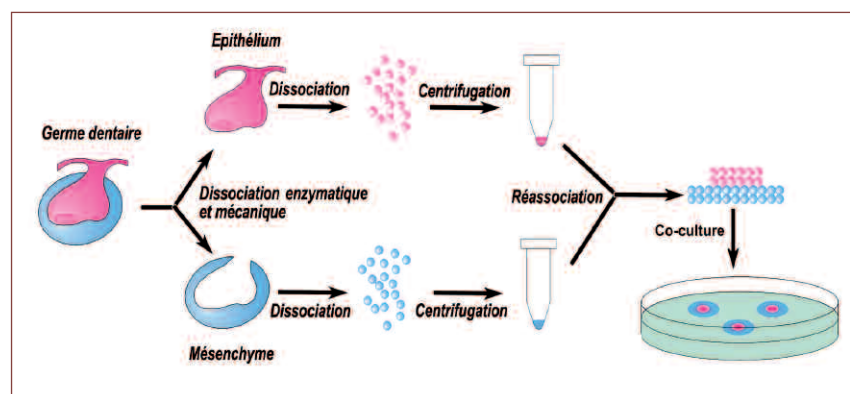


Schéma 1. Représentation schématique des réassociations et de leur mise en culture

supplémenté avec de l'acide ascorbique (0,18 mg/ml, Merck), L-glutamine (2mM, Gibco), pénicilline/streptomycine (50 unités/ml, Gibco), sérum de veau fœtal (20%) et solidifié par de l'agar (0,36%, Sigma) (Hu et coll. 2005a et b) (Schéma 1).

Les réassociations sont congelées dans de l'OCT et débitées en coupes de 7 mm. Les coupes obtenues sont traitées comme les coupes de têtes (voir paragraphe 1.1).

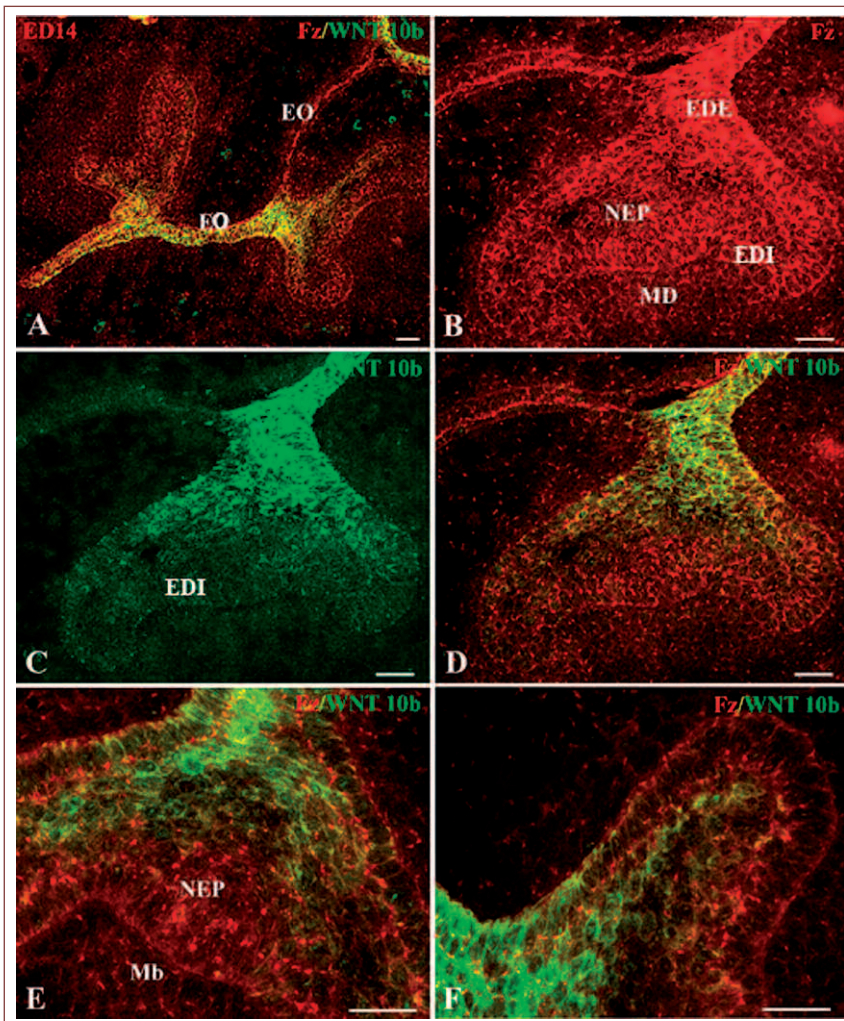
## 2. RÉSULTATS

### 2.1. WNT 10b

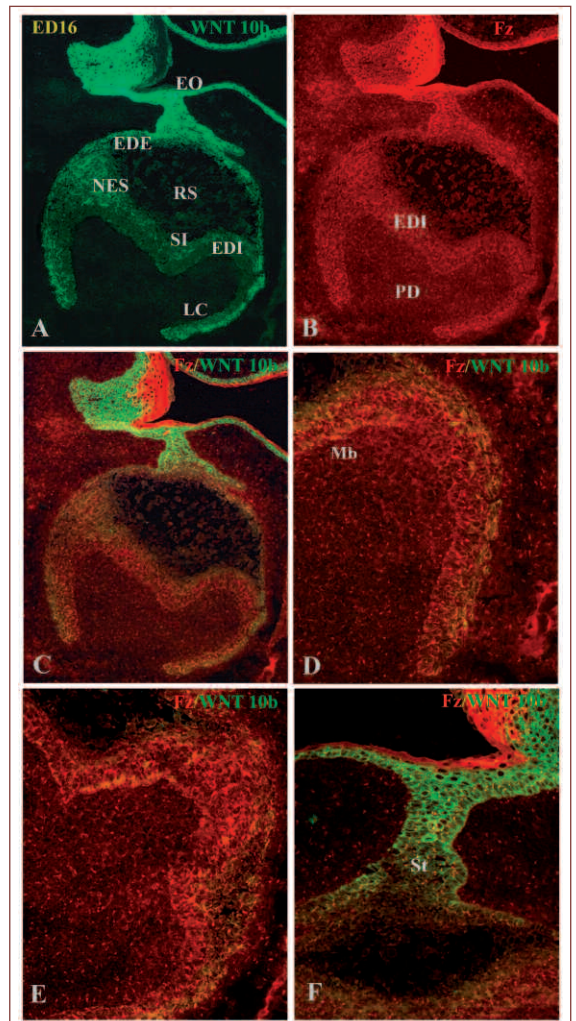
À E14, WNT10b est présent dans l'épithélium oral (EO) (Figure 1A), dans l'épithélium dentaire externe (EDE) (Figure 1B, C, D) avec un marquage plus important du côté buccal. Au niveau du nœud de l'émail primaire (NEP), il n'y a pas de marquage pour WNT10b (Figure 1E). Frizzled (Fz) est présent dans tout le germe dentaire : l'EO, (Figure 1A), l'EDE, l'épithélium dentaire interne (EDI), le NEP et le mésenchyme dentaire (MD) (Figure 1A, B). Avec l'anticorps anti-Fz, on peut également remarquer un marquage de la membrane des cellules épithéliales jusqu'à proximité de la membrane basale (Mb) (Figure 1E).

À E16, WNT10b est présent dans le stalk reliant l'organe de l'émail à l'EO (Figure 2A, F), dans l'EDE jusqu'à la lèvre cervicale (LC) (Figure 2A) et dans le stratum intermedium (SI) (Figure 2A). Au niveau de l'EDI le marquage de WNT10b est plus faible que celui de l'EDE (Figure 2A). Au niveau de la pulpe dentaire (PD) le marquage pour WNT10b reste négatif (Figure 2A, C, D, E). Fz est présent dans l'ensemble des tissus dentaires et péri-dentaires (Figure 2B) excepté le réticulum stellaire (RS) (Figure 2A, B, C, F).

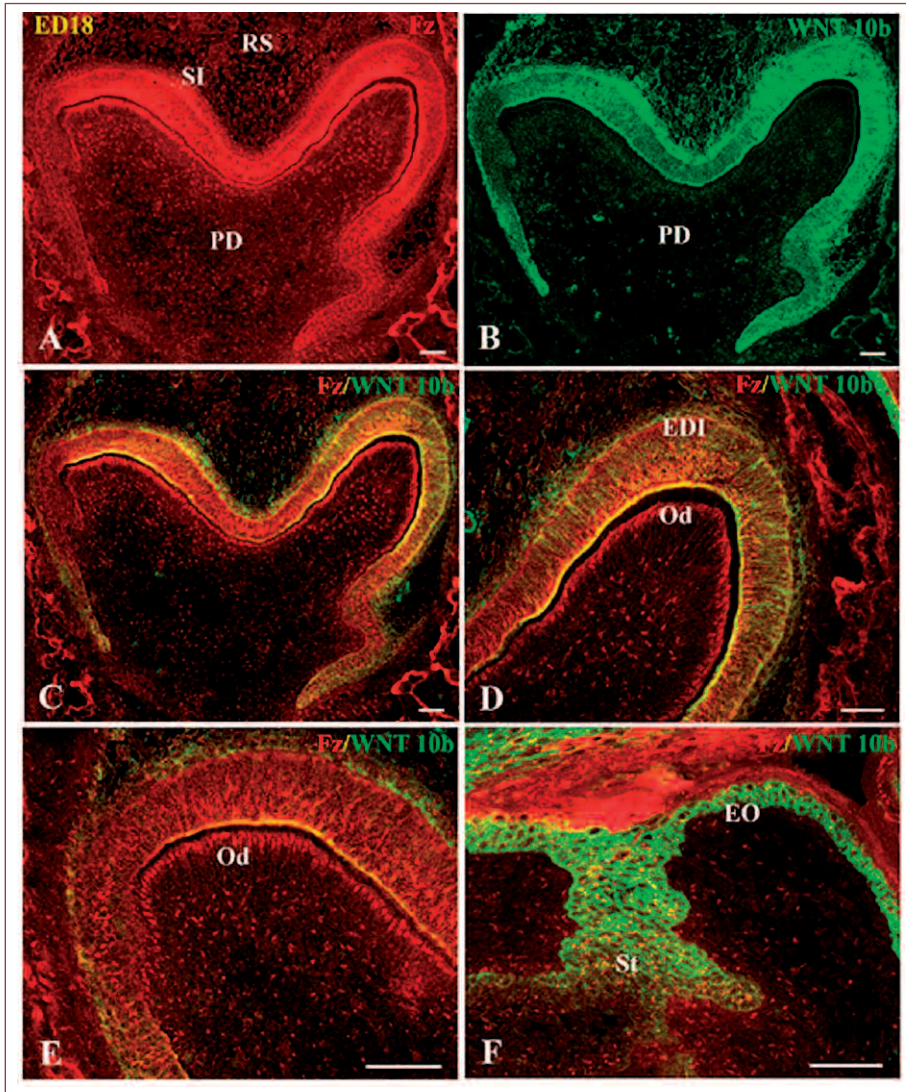
À E18, pour WNT10b on retrouve le même marquage qu'à E16 avec un marquage plus important au niveau de l'EDI et du SI (Figure 3B-F). Pour Fz, le mar-



**Figure 1.** Immunolocalisation de WNT10b et Frizzled (Fz) à E14. On observe un marquage pour WNT10b dans l'épithélium oral (1A) ainsi que Fz (1A). WNT10b, dans l'EDE, présente une asymétrie avec un marquage plus fort du côté buccal de la dent (1C, D), WNT10b est absent du NEP (1E) Fz est présent dans toute la dent (1B, D, E, F) et particulièrement au niveau du pôle basal des cellules épithéliales. EDE épithélium dentaire externe, EDI : épithélium dentaire interne, EO : épithélium oral, Mb : membrane basale, MD : mésenchyme dentaire, NEP : nœud de l'émail primaire. Barre=75 μm.



**Figure 2.** Immunolocalisation de WNT10b et Fz à E16. On observe un marquage pour WNT10b dans le stalk (2F), l'EDE jusqu'à la lèvre cervicale (LC), le stratum intermedium (SI) (2A, C). Pour Fz le marquage est présent dans les tissus dentaires et péri-dentaires (2B, C, D, E, F) et particulièrement associé à la Mb. LC : lèvre cervicale, NES : nœud de l'émail secondaire, PD : pulpe dentaire, RS : réticulum stellaire, SI : stratum intermedium, St : stalk Barre=75 μm.



**Figure 3.** Immunolocalisation de WNT 10b et Fz à E18. On observe un marquage de l'EDI avec WNT10b et Fz alors que seul Fz est présent dans la couche odontoblastique (3C, D, E). Le stalk est toujours fortement marquée avec WNT 10b. La pulpe dentaire n'est marquée que pour Fz (3A, C, D, E). pAm : préaméloblastes, Od : odontoblastes, PD : pulpe dentaire. Barre=75 mm.

quage persiste dans l'ensemble des tissus dentaires et péri-dentaires avec un marquage plus important au niveau de la couche odontoblastique (**Figure 3A, C-F**). On peut donc observer une disparité dans la distribution de WNT10b et du récepteur surtout visible au niveau des odontoblastes et des préaméloblastes mais la colocalisation des antigènes est visible par la couleur jaune-orangée du marquage (**Figure 3C, D, E**).

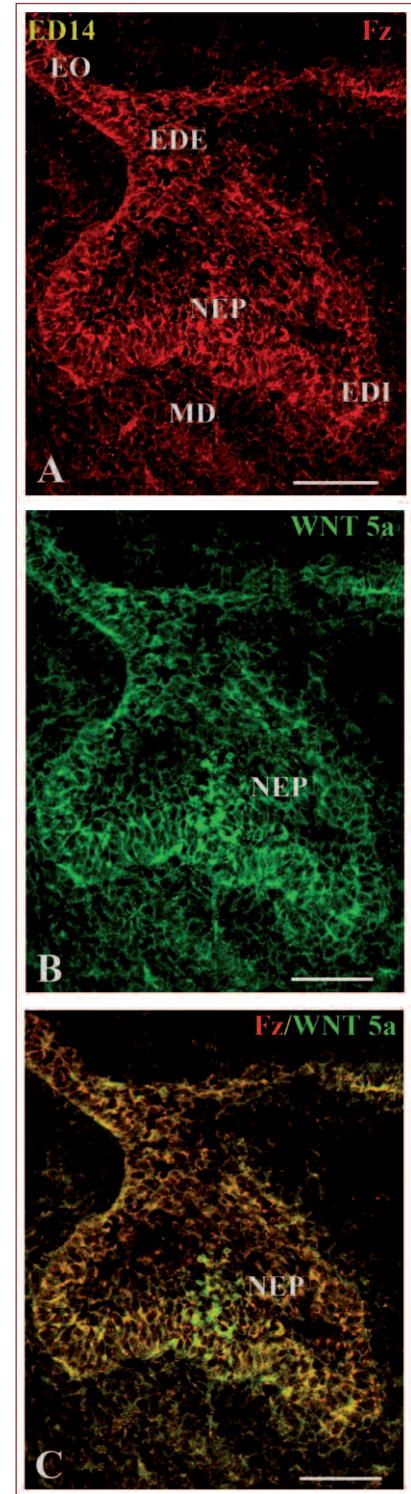
### 2.2. WNT 5a

À E14, WNT5a et Fz sont présents au niveau de tous les tissus dentaires et péri-dentaires : l'EO, l'EDE, l'EDI, le NEP, le MD et le mésenchyme péri-dentaire (MPD) (**Figure 4A, B, C**). On observe ainsi une colocalisation du mar-

quage de la protéine et du récepteur. Le marquage est toutefois plus fort au niveau de la composante épithéliale.

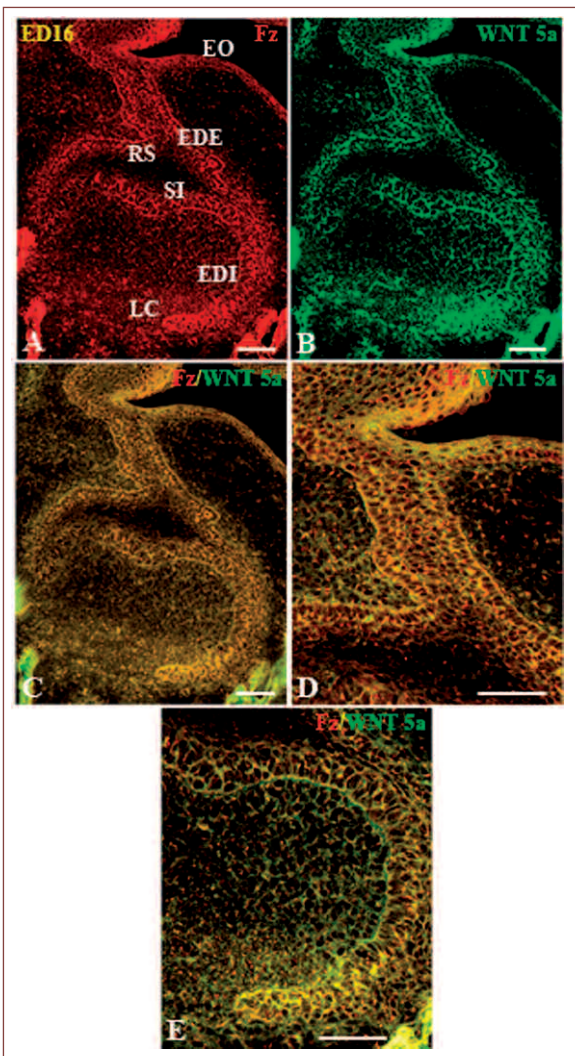
À E16, l'ensemble des tissus dentaires et péri-dentaires reste positif pour WNT5a et Fz à l'exception du réticulum stellaire (RS) (**Figure 5A-E**).

À E18, pour WNT5a on retrouve le même marquage qu'à E16 avec un marquage plus important au niveau de l'EDI (**Figure 6 B-F**). Pour Fz, le marquage persiste dans l'ensemble des tissus dentaires et péri-dentaires avec un marquage plus important au niveau de la couche odontoblastique (**Figure 6A, C-F**). La colocalisation des antigènes est visible par la couleur jaune-orangée du marquage (**Figure 6C-F**).

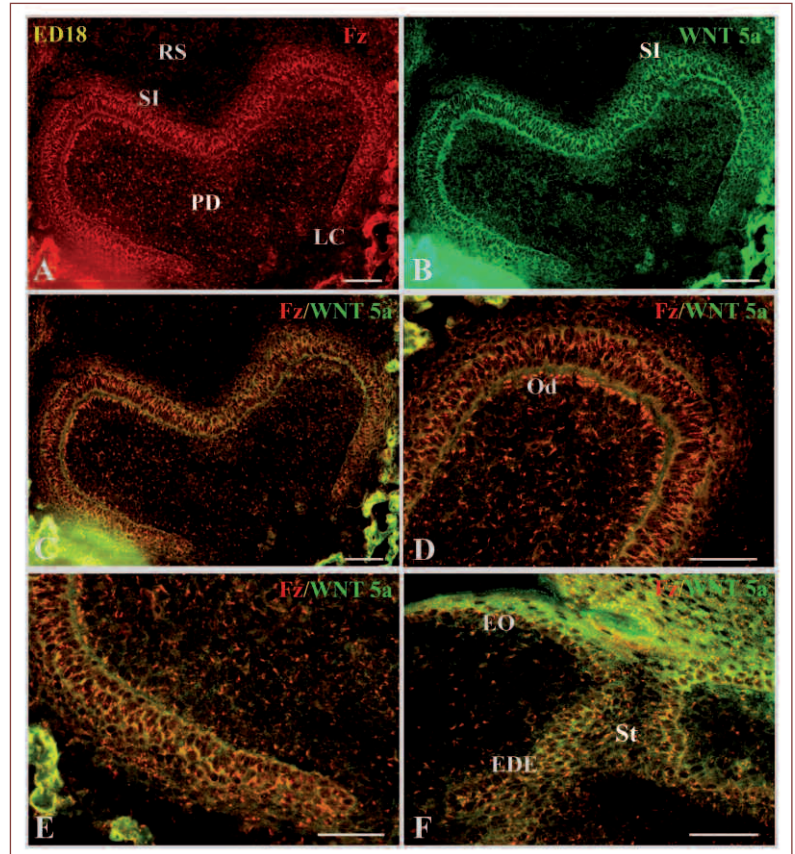


**Figure 4.** Immunolocalisation de WNT 5a et Fz à E14. On observe un marquage intense de l'EDE et l'EDI pour WNT 5a et Fz (4A, B, D, E) et particulièrement dans les cellules du NEP (3B, E). Il y a également un marquage au niveau du MD avec les 2 anticorps. Barre=75 mm.

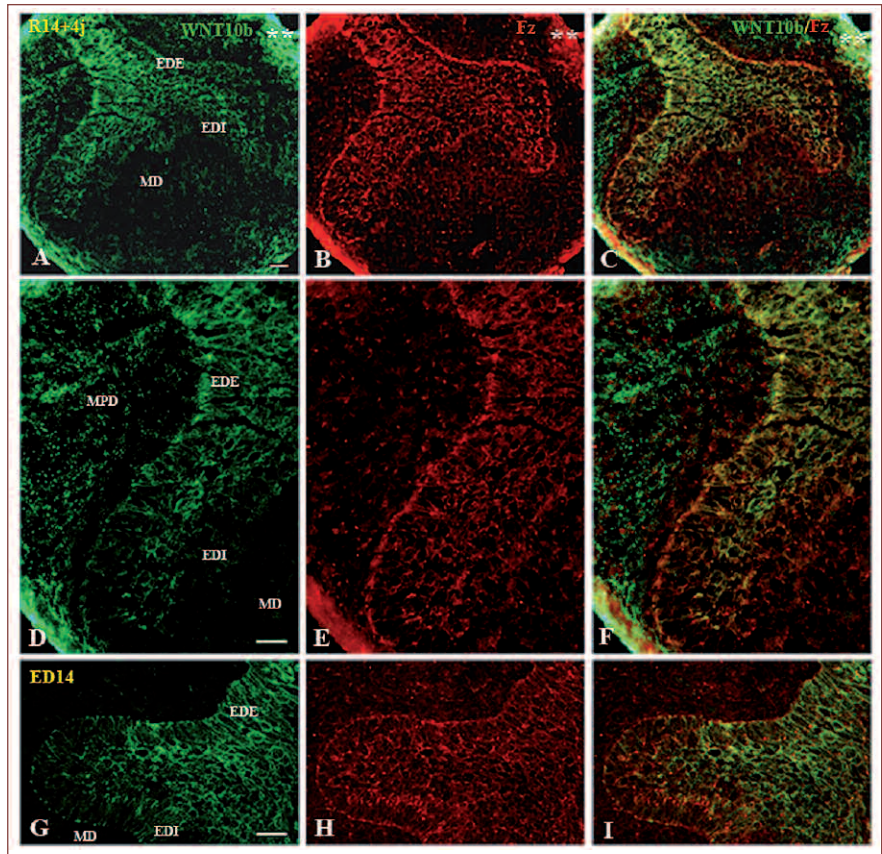




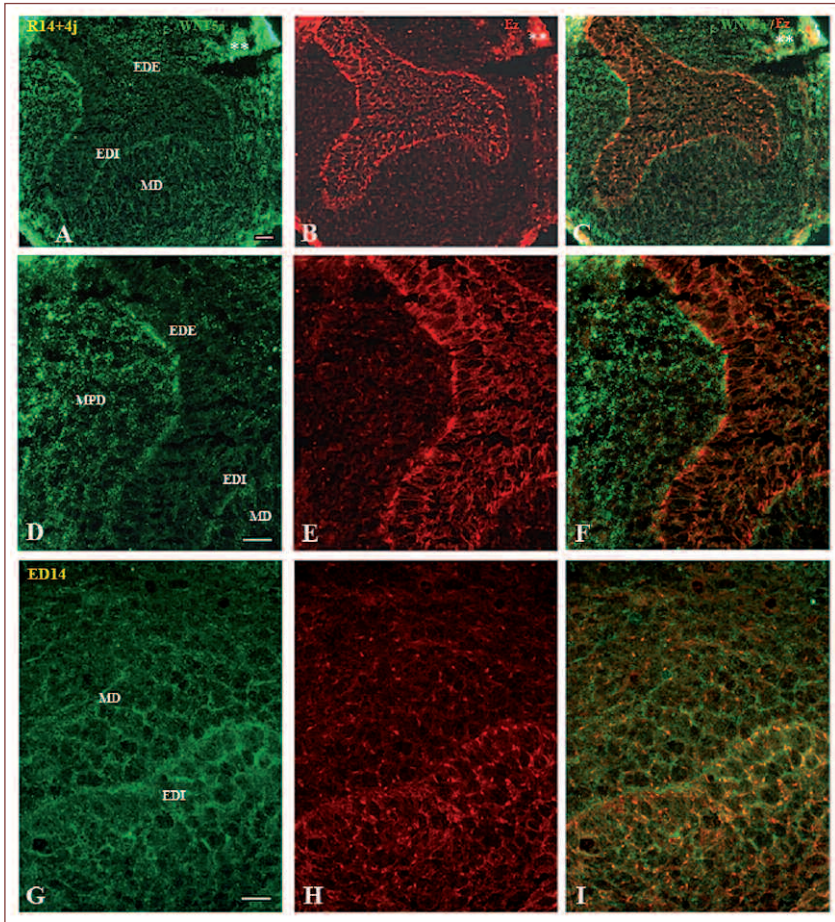
**Figure 5.** Immunolocalisation de WNT5a et Fz à E16. On observe un marquage épithélial et mésenchymateux pour les 2 antigènes ainsi que le pôle basal des cellules épithéliales (Mb) (5A, B, E, F). On peut observer une superposition du marquage WNT5a/Fz (5C, D, G, H). Barre=75 mm.



**Figure 6.** Immunolocalisation de WNT5a et Fz à E18. On observe une superposition des marquages au niveau de l'épithélium et du pôle basal des cellules épithéliales (Mb) pour WNT5a et Fz (6C, D, E, F). La PD et l'EDI sont marqués également avec les 2 anticorps (6D, L). La couche odontoblastique est positive pour Fz (6D). Barre=75 mm.



**Figure 7.** Immunolocalisation de WNT10b (A,C,D,F) et Fz (B,C,E,F) dans les réassociations cellulaires épithéliales-cellules mésenchymateuses après 4j de culture (R14+4j) et WNT10b (G,I) et Fz (H,I) dans les molaires ex vivo à ED14. MPD : mésenchyme périodentaire. Barre= 75 mm. Les étoiles représentent l'artefact de marquage du à la culture.



**Figure 8.** Immunolocalisation de WNT5a (A,C,D,F) et Fz (B,C,E,F) dans les réassociations cellulaires épithéliales-mésenchymateuses après 4j de culture (R14+4j) et WNT5a (G,I) et Fz (H,I) dans les molaires *ex vivo* à ED14. Barre= 75 µm.

### 2.3. RÉASSOCIATIONS ENTRE CELLULES MÉSENCHYMATEUSES ET CELLULES ÉPITHÉLIALES DISSOCIÉES

Nous avons mis au point des réassociations entre cellules épithéliales et cellules mésenchymateuses qui aboutissent à la formation de molaires *in vitro* (Hu et coll., 2005a et b). Il nous a semblé intéressant d'étudier la localisation des WNTs et de Fz dans ces réassociations après 4 jours de culture lorsqu'elles atteignent le stade de capuchon dentaire et qu'un NEP se forme (Hu et coll. 2005a et b).

Nous avons tout d'abord vérifié par PCR qu'il n'y avait aucune contamination d'un tissu par un autre et que les cellules utilisées étaient correctement dissociées : expression spécifique de *fgf10* pour le mésenchyme et de *pitx2*, *shh* et *fgf4* pour l'épithélium (Hu et coll. 2006). Après dissociation, la structure du NEP n'existe plus et toute information de position des cellules épithéliales est perdue.

Les cellules épithéliales au contact des cellules mésenchymateuses peuvent provenir du NEP, de l'EDI, l'EDE, le SI ou le RS. Après 3 à 4 jours de culture, il est possible d'obtenir une histogenèse épithéliale dentaire (Hu et coll., 2005a et b) avec la condensation d'un groupe de cellules ayant l'apparence histologique et les spécificités d'un NEP : cellules BrdU négatives, expression de *shh*, apoptoses (Hu et coll., 2006).

Dans les réassociations après 4 jours de culture, WNT10b est présente dans le stalk, l'EDE et le mésenchyme péri-dentaire (MPD). L'EDI et le MD présentent un marquage plus faible que le reste des composantes du germe dentaire (Figure 7A, C, D, F). En comparaison avec le germe dentaire de 14 jours *ex vivo*, WNT10b est absente du MPD et du MD (Figure 7G, I). Fz est présent dans les tissus dentaires et péri-dentaires (Figure 7B, C, E, F) et ne montre aucune différence avec ED 14 *ex*

*vivo* (Figure 7H, I). La colocalisation des antigènes est visible par la couleur jaune-orangée du marquage (Figure 7C, F, I) principalement au pôle basal des cellules de l'EDE comme on a pu l'observer *ex vivo* à E14 (Figure 1E).

WNT5a est principalement localisé dans le MD et le MPD (Figure 8A, D) alors que chez ED 14 *ex vivo* il est présent dans tous les tissus dentaires et péri-dentaires (Figure 8G). Fz ne montre aucune différence de marquage entre les réassociations et les germes dentaires *ex vivo* (Figure 8B, E, H). La colocalisation des antigènes est visible par la couleur jaune-orangée du marquage (Figure 8C, F, I).

### 3. DISCUSSION

Au cours du développement dentaire, différents membres d'une même famille de protéines peuvent donc avoir des localisations variables. WNT10b est essentiellement présent dans l'épithélium alors que WNT5a n'a pas de spécificité tissulaire. WNT5a est présent dans le NEP où les cellules ne se divisent pas alors que WNT10b en est totalement absent. S'il peut exister des redondances fonctionnelles entre certains WNTs (Clevvers, 2006 ; Crosnier et coll., 2006), les différences de localisation que l'on observe entre WNT5a et WNT10b suggèrent des effets différents et complémentaires pour ces deux protéines.

L'anticorps utilisé contre le récepteur Fz reconnaît tous les membres de cette famille. Fz est un récepteur transmembranaire et les WNTs sont des protéines solubles. On ne retrouve pas une superposition exacte entre la protéine et le ligand pour WNT10b et Fz. Par contre pour WNT5a et Fz, il y a une colocalisation du ligand et du récepteur dans la dent. On peut observer dans certaines régions comme le pôle basal des cellules épithéliales une codistribution de WNT à son récepteur. De plus, les WNTs peuvent se lier à d'autres récepteurs tels que LRP5 et LRP6 (Miller, 2001) et également présentent une affinité pour des glycosaminoglycans à héparane sulfate (Baerg et coll., 2001) qui pourrait ne pas être la même pour tous les WNTs.

Si on compare la localisation des gènes et des protéines, on observe qu'au stade de capuchon le gène codant pour WNT10b est exclusivement présent dans le NEP (Sarkar et Sharpe, 1999, Dassule et McMahon, 1998) alors que la protéine est présente dans l'EDE et totalement absente du NEP. Au stade de cloche, *wnt10b* est exprimé dans l'EDI et la protéine est présente dans l'EDI et l'EDE. Pour ce qui concerne WNT5a, le gène est spécifiquement exprimé dans le mésenchyme puis dans la pulpe dentaire (Sarkar et Sharpe, 1999) alors que la protéine est localisée dans l'épithélium et le mésenchyme. D'après la localisation des protéines et des gènes, on peut envisager une action locale des protéines mais également à distance (Zecca et coll., 1996).

L'immunolocalisation nous a permis d'observer une distribution spatio-temporelle conforme avec le rôle que l'on attribue aux WNTs et à leur récepteur Fz en particulier dans la prolifération et la différenciation des cellules épithéliales. Dans la molaire, WNT10b est localisée dans des zones à activité mitotique élevée comme la lèvre cervicale alors qu'elle est absente du NEP où les cellules ne se divisent pas. Par contre pour WNT5a, nous n'avons pas de localisation spécifiquement épithéliale ce qui suggère que ces deux WNTs pourraient jouer des rôles complémentaires dans la prolifération et la différenciation des cellules dentaires.

En effet, dans les tissus faisant intervenir des interactions épithélio-mésenchymateuses les WNTs ont été impliquées. On leur attribue un rôle dans la différenciation de l'épithélium mammaire chez l'embryon (Boras-Granic et coll., 2006). Dans l'intestin, au niveau des cellules épithéliales des cryptes, les WNTs ont été impliquées dans le maintien des cellules en état de prolifération (Crosnier et coll., 2006). Il a été montré également que WNT10b stimule la différenciation des cellules épithéliales de la peau (Ouji et coll., 2006a) et le développement des follicules pileux (Ouji et coll., 2006b).

Nous avons montré que les réassociations entre cellules dentaires épithéliales et mésenchymateuses en culture peuvent

conduire à la formation d'une couronne dentaire avec mise en place de l'histogénèse épithéliale, morphogénèse de la jonction épithélio-mésenchymateuse et formation des cuspidés ainsi que la différenciation des odontoblastes et polarisation des améloblastes (Hu et coll., 2005a). Dans ces réassociations, la localisation du récepteur Fz est identique à celle de la molaire *ex vivo*. Par contre pour WNT10b on détecte sa présence dans le mésenchyme péri-dentaire qui pourrait être du à un effet de la culture. Pour WNT5a, on observe surtout un marquage mésenchymateux se superposant à l'expression du gène. C'est pourquoi, nous envisageons d'étudier la localisation des WNTs et de leur récepteur Fz dans des réassociations au stade de cloche puis lorsque les odontoblastes et les améloblastes se différencient. Nous pourrions également faire des tests fonctionnels en cultivant les réassociations en présence des anticorps anti-WNTs afin d'évaluer si ces anticorps sont capables d'inhiber la prolifération et la différenciation des cellules épithéliales. Nous pourrions également étudier la localisation des WNTs et de Fz après implantation des réassociations ce qui permet l'obtention de racines (Hu et coll., 2006).

#### BIBLIOGRAPHIE

MILLER J.R. The Wnts. *Genome Biol.* 2002 3: REVIEWS3001.

ALONSO L., FUCHS E. Stem cells of the skin epithelium. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003, 1: 11830-11835.

HUELSEN J., BIRCHMEIER W. New aspects of Wnt signaling pathways in higher vertebrates. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 2001 11: 547-553.

CLEVERS H. Wnt/b-catenin signalling in development and disease. *Cell* 2006 127: 469-480.

HABAS R., DAWID I.B., HE X. Coactivation of Rac and Rho by Wnt/Frizzled signaling is required for vertebrate gastrulation. *Genes Dev.* 2003 17 : 295-309.

BHANOT P., BRINK M., SAMOS C.H., HSIEH J.C., WANG Y., MACKE J.P., ANDREW D., NATHANS J., NUSSE R. A new member of the Frizzled family from *Drosophila* functions as a Wingless receptor. *Nature* 1996 382: 225-230.

DASSULE H.R., MCMAHON A.P. Analysis of epithelial-mesenchymal interactions in the initial morphogenesis of the mammalian tooth. *Dev. Biol.* 1998 202 : 215-227.

SARKAR L., SHARPE P.T. Expression of Wnt signalling pathway genes during tooth development. *Mech. Dev.* 1999 85 : 197-220.

KRATOCHWILL K., GALCERAN J., TONTSCH S., ROTH W., GROSSCHEDL R. FGF4, a direct target of LEF1 and Wnt signaling, can rescue the arrest of tooth organogenesis in *Lef1*<sup>-/-</sup> mice. *Genes Develop.* 2002 16 : 3173-3185.

CHEN Y., WHETSTONE H.C., YOUN A., NADESAN P., CHOW E.C., LIN A.C., ALMAN B.A. Beta-catenin signaling pathway is crucial for bone morphogenetic protein 2 to induce new bone formation. *J. Biol. Chem.* 2006 (sous presse).

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 8: 2069-2075.

HU B., NADIRI A., BOPP-KUCHLER S., PERRIN-SCHMITT F., LESOT H. Dental epithelial histomorphogenesis *in vitro*. *J. Dent. Res.* 2005a 84: 521-525.

HU B., NADIRI A., BOPP-KUCHLER S., PERRIN-SCHMITT F., WANG S., LESOT H. Dental epithelial histomorphogenesis in the mouse : positional information versus cell history. *Arch. Oral Biol.* 2005b 50: 131-136.

BAERG G.H., LIN X., KHARE N., BAUMGARTNER S., PERRIMON N. Heparan sulfate proteoglycans are critical for the organization of the extracellular distribution of Wingless. *Development* 2001 128: 87-94.

ZECCA M., BASLER K., STRUHL G. Direct and long-range action of a Wingless morphogen gradient. *Cell* 1996 87: 833-844.

BORAS-GRANIC K., CHANG H., GROSSCHEDL R., HAMEL P.A. *Lef1* is required for the transition of Wnt signaling from mesenchymal to epithelial cells in the mouse embryonic mammary gland. *Dev. Biol.* 2006 295: 219-231.

CROSNIER C., STAMATAKI D., LEWIS J. Organizing cell renewal in the intestine : stem cells, signals and combinatorial control. *Nature Reviews* 2006 7: 349-359.

OUJI Y., YOSHIKAWA M., SHIROI A., ISHIZAKA S. Wnt-10b promotes differentiation of skin epithelial cells *in vitro*. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 2006a 342: 28-35.

OUJI Y., YOSHIKAWA M., SHIROI A., ISHIZAKA S. Promotion of hair follicle development and trichogenesis by Wnt-10b in cultured embryonic skin and in reconstituted skin. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 2006b 345 : 581-587.

**Article publié au journal « Les cahiers de l'ADF » volume 25, 1<sup>er</sup> trimestre 2009, pages : 22-**

**28**

## **Ingénierie tissulaire dentaire : cinétique de la mise en place de la vascularisation**

### **Tooth tissue engineering : Kinetic of vascularization**

Adnane Nait Lechguer 1,2, Sabine Kuchler-Bopp 1, Latifa Tricha 3, Amel Elouazzani Ech-Chahdi 3, Youssef Haïkel 1,2 et Hervé Lesot 1,2,4

1. INSERM UMR 595, Faculté de Médecine, 11, rue Humann, Strasbourg, France.
2. Faculté de chirurgie dentaire, Université Louis Pasteur, Strasbourg, France.
3. Faculté de chirurgie dentaire, Université Hassan 2, Casablanca, Maroc.
4. International Collaborating Centre in Oro-facial Genetics and Development, University of Liverpool, School of Dental Sciences, Liverpool.

**Origine des crédits:** INSERM, ULP (Faculté de Chirurgie Dentaire), IFRO.

**Remerciements:** Les auteurs remercient M. Hervé Gegout pour sa précieuse aide en histologie.

**Mots clés:** Dent, Ingénierie tissulaire, Odontogenèse, Vascularisation.

**Keys words:** Tooth, Tissue engineering, Odontogenesis, Vascularization.

## **Résumé**

Nos résultats précédents montrent que les vaisseaux sanguins se mettent en place progressivement dans les différents compartiments de la dent. Au stade de cloche, ils pénètrent dans l'organe de l'émail à travers l'épithélium dentaire externe, à ce même stade commence la différenciation fonctionnelle des odontoblastes et des améloblastes: sécrétion de prédentine/dentine puis de l'émail. In vitro, il est possible d'obtenir le développement d'une couronne dentaire à partir des réassociations entre des cellules dentaires épithéliales et mésenchymateuses avec le maintien des structures de type vasculaire, toutefois non fonctionnelles. L'implantation de ces cultures permet l'obtention de la rhizogenèse avec la formation du ligament périodontal. Après implantation, les vaisseaux sanguins sont présents tout d'abord autour des implants, puis dans la pulpe dentaire et dans l'organe de l'émail. La seule différence entre les molaires et les réassociations implantées est liée à la cinétique du processus. La revascularisation progresse plus rapidement dans les molaires intactes que dans les réassociations. Toutes ces données doivent permettre une meilleure compréhension des mécanismes gouvernant le développement dentaire et sont susceptibles d'être utilisées pour développer une nouvelle stratégie d'ingénierie tissulaire dentaire.

## **Abstract**

To develop a strategy of tooth tissue engineering, several parameters must be considered including: a) morphogenesis of the tooth crown, b) development of roots and periodontal tissues and c) vascularization, which plays a critical role in organogenesis and cytodifferentiations. To study the vascularization in our cell-cell reassociations (our tooth tissue engineering model), we first followed: a) the fate of blood vessels in cultured teeth and reassociations and b) the kinetic of revascularization after implantation in adult mice. The results revolved that in the cultured tooth germs and engineered tooth crowns, blood vessels-like structures stopped to grow but could be maintained in the peridental mesenchyme. However, after implantation, blood vessels have a sequential developing pattern in different compartments of the tooth. Both cultured tooth germs and engineered tooth crowns allowed further mineralized dentin and enamel deposition, and root periodontium formation. They became fully revascularized. Our study confirmed and expanded previous results by systematically describing tooth vascularization from the cap stage to amelogenesis. Our results determined the kinetic of vascularization of implanted tooth germs and reassociations and showed that vascularization not only allowed their survival but also afforded growth. All these data should provide a better understanding of the mechanisms governing the tooth development and may be used to develop a new strategy for tooth tissue engineering.

## INTRODUCTION

La régénération de l'organe dentaire fonctionnel est un défi pour les chercheurs dans les domaines de la biologie et de médecine régénérative. De nombreux progrès ont été réalisés ces dernières années dans la recherche de cellules souches et de biomatériaux permettant la fabrication de supports biodégradables «scaffold». Plusieurs paramètres doivent être pris en compte pour élaborer une stratégie d'ingénierie tissulaire dentaire permettant d'obtenir des dents anatomiquement et physiologiquement fonctionnelles : a) la morphogenèse de la couronne dentaire (Nait Lechguer et coll., 2007 ; 2009) ; b) le développement de racines et des tissus de soutien dentaires (Hu et coll., 2006) et c) la vascularisation, qui joue un rôle capital dans l'organogenèse et les cytodifférenciations (Thisse et Zon, 2002).

La vascularisation est indispensable au bon déroulement du développement de tout tissu ou organe. Les vaisseaux sanguins assurent l'apport des nutriments dont l'oxygène et les échanges métaboliques nécessaires pour l'organogenèse (Thisse et Zon, 2002). La formation des vaisseaux nécessite l'intervention coordonnée de facteurs multiples. Cela comprend des molécules dont l'activité est essentiellement vasculaire comme l'angiogénine, l'angiotropine, le facteur de perméabilité vasculaire et surtout des facteurs de croissance (VEGF, FGFs, PDGF, etc.) ainsi que des molécules telles que les BMPs dont les effets sont beaucoup plus larges (Cebe-Suarez et coll., 2006).

Nous avons déterminé les conditions expérimentales permettant d'obtenir le développement coronaire, incluant la morphogenèse globale, l'histogenèse épithéliale et la différenciation d'odontoblastes et d'améloblastes. La formation des racines a été obtenue après implantation sous-cutanée chez la souris adulte de réassociations cultivées. Dans ces conditions, les racines sont associées à un tissu de soutien complet : ciment, ligament péri-dentaire et os néo-formé (Hu et coll., 2006).

Pour compléter notre projet de développement d'une nouvelle stratégie d'ingénierie tissulaire dentaire, nous avons abordé l'étude de la vascularisation dans notre modèle de réassociation. Toutefois cela nécessitait une étude préalable du devenir des vaisseaux sanguins *in vitro* dans le cas de cultures des dents et des réassociations. Nous avons suivi le développement *in vivo* et l'évolution *in vitro* des vaisseaux avant qu'ils entrent dans la pulpe dentaire (culture de GM14), puis leur devenir *in vitro* quand ils étaient déjà présents dans la pulpe dentaire (culture de GM16) et finalement nous avons cherché à déterminer la cinétique de la vascularisation après implantation des dents et réassociations cultivées chez la souris adulte.

Pour ce travail, nous avons utilisé des anticorps dirigés contre : CD31 (PECAM-1) qui est une protéine membranaire, située au niveau des jonctions intercellulaires des cellules endothéliales (Fujiwara, 2006 ; Ilan and Madri, 2003), et le collagène type IV utilisé pour marquer les membranes basales du germe dentaire et la membrane basale vasculaire.

## **I. MATERIEL ET METHODES**

### **I. Matériel**

Nous utilisons les souris de la souche ICR et considérons comme jour 0 de la gestation, le jour de mise en évidence du bouchon vaginal. Les souris gestantes sont sacrifiées conformément aux recommandations de la Communauté Economique Européenne (86/609-CEE).

### **Prélèvement des germes dentaires et dissociations tissulaires**

Après prélèvement des ébauches de premières molaires inférieures à l'aide d'un stéréomicroscope (Leica MZ 9,5) sur les embryons du jour 14, les épithéliums et mésenchymes dentaires sont dissociés mécaniquement après un traitement enzymatique à la trypsine (Difco) à 1% dans le milieu de culture DMEM/F12 à 4°C pendant 30 min, l'action de la trypsine est arrêtée par l'addition de sérum (Fig. 1). Après séparation de ces deux tissus, le tissu épithélial est dissocié en cellules épithéliales et le tissu mésenchymateux en cellules mésenchymateuses (Fig. 1). La séparation des cellules se fait mécaniquement à l'aide d'un filtre de 70 µm. Puis les deux types cellulaires sont centrifugés séparément à 9000 g pendant 2 min. Des fragments du culot épithélial sont réassociés avec des fragments du culot mésenchymateux et mis en culture (Fig. 1).

### **Cultures *in vitro***

Deux types de cultures ont été utilisées pour cette étude, les germes de molaires intactes (GM14, GM16) et les réassociations (R14). Les cultures ont été maintenues de 1 à 8 jours sur un milieu semi-solide à 37°C dans une étuve à CO<sub>2</sub> (5%) en atmosphère humide. Le milieu, DMEM/F-12 (Gibco), est supplémenté en acide ascorbique (0,18 mg/ml, Merck), L-Glutamine (2mM, Gibco), pénicilline/streptomycine (50 unités/ml, Gibco), sérum de veau fœtal (20%) et solidifié par de l'agar (0,36%, Sigma). Le milieu de culture est changé tous les deux jours.

### **Implantation**



Après 6 et 8 jours de culture *in vitro*, les cultures ont été implantées en sous-cutané dans une zone située derrière l'oreille ou dans le diastème mandibulaire chez les souris ICR âgées de 18 à 20 semaines. Les implants ont été maintenus *in vivo* de 4 jours à 2 semaines.

## **Histologie**

Les échantillons sont fixés au Bouin-Hollande pour une durée de 12 h à 7 jours en fonction de leur taille. Ils sont ensuite inclus dans la paraffine après déshydratation puis débités en coupes sériées de 5µm. Les coupes sont déparaffinées et colorées avec le colorant de Mallory.

## **Immunofluorescence**

Les coupes examinées proviennent de situations différentes : a) Culture *in vitro* : les cultures sont arrêtées à 1, 6 et 8 jours pour les germes de molaires intactes et les réassociations, disposées dans un milieu d'inclusion (Tissu Tek) et stockées à -30°C. b) Implantation *in vivo* : Les implants sont récupérés, inclus dans du Tissu tek, congelés et stockés à -30°C. Tous les échantillons ont été débités en coupes de 7 µm, qui sont récupérées sur des lames « Superfrost ». Ensuite, les coupes sont saturées dans 1% BSA/PBS pendant 20 min, puis, incubées avec les anticorps primaires spécifiques à température ambiante : anti-CD 31 (BD Biosciences Pharmigen) dilution 1/100 et anti-Collagène type IV (Abcam) dilution 1/400 pendant 2h. Après 3 lavages de 5 min avec le PBS, les coupes sont incubées avec les anticorps secondaires correspondants, à température ambiante : anti-rat (IgG) Alexa 488 dilution 1/200 et anti-lapin (IgG) dilution 1/500 Alexa 594 (Molecular Probes) pendant 2h. Enfin, après 3 lavages avec du PBS, les coupes sont montées avec du milieu de montage Dakocytomation (Dako), recouvertes d'une lamelle et observées au microscope Leica (DM 4000).

## **RESULTATS**

### **Vascularisation au cours du développement des germes dentaires *ex vivo* et *in vitro***

Au 14ème jour (E14) de gestation, les germes de la première molaire inférieure (GM14) sont au stade de capuchon (Fig. 2A). A ce stade, CD31 est détecté dans la partie inférieure du mésenchyme dentaire (MD) et dans le mésenchyme périodentaire (MPD) (Fig. 2B). Dans l'épithélium dentaire aucun marquage n'est observé. Après 1 jour de culture, les germes dentaires (GM14+1) restent au stade de capuchon. CD31 est détecté dans le mésenchyme périodentaire (MPD) (Fig. 2C). L'épithélium dentaire et le mésenchyme sont négatifs pour cet antigène. Après 6 jours de culture, les germes dentaires (GM14+6) atteignent le stade de la cloche tardive. CD31 persiste dans l'ensemble du mésenchyme périodentaire (MPD) (Fig. 2D). L'épithélium dentaire et la pulpe dentaire restent négatifs pour cet antigène.

Au 16ème jour (E16) de gestation les germes de la première molaire inférieure (GM16) sont au stade de cloche précoce (Fig. 2E). CD31 est présent dans la partie centrale de la pulpe dentaire (PD) (Fig. 2F). Dans le mésenchyme périodentaire (MPD), nous avons observé un marquage au contact de la membrane basale associée à l'épithélium dentaire externe (EDE), excepté à l'extrémité de la lèvre cervicale (LC) (Fig. 2F). Dans l'organe de l'émail, il n'y a pas de marquage (Fig. 2F). Après 1 jour de culture, les germes dentaires (GM16+1) restent au stade de cloche précoce. CD31 est présent dans l'ensemble de la pulpe dentaire et le mésenchyme périodentaire (Fig. 2G). Après 6 jours de culture, dans les germes dentaires (GM16+6) au stade de cloche tardive, CD31 persiste uniquement dans le mésenchyme périodentaire (Fig. 2H).

## II. Vascularisation au cours du développement des réassociations *in vitro*

Après 6 et 8 jours de culture *in vitro* des réassociations (R14+6 et R14+8) cellules épithéliales (CE)/cellules mésenchymateuses (CM), les cultures atteignent le stade de la cloche (Fig. 2I, 2J). CD31 est détecté dans le mésenchyme périodentaire (Fig. 2K). Il n'y a pas de marquage ni dans la pulpe dentaire ni dans l'organe de l'émail (Fig. 2K).

### Vascularisation dans les implants *in vivo*

Après 6 jours de culture, les germes molaires atteignent le stade de cloche précoce (Fig. 2D). Ils ont été implantés chez les souris ICR adultes.

Après 2 jours d'implantation, les vaisseaux sanguins ont été observés dans le mésenchyme périodentaire et la partie inférieure de la pulpe dentaire (Fig. 3A). Après 4 jours d'implantation, les vaisseaux sanguins commencent à entrer dans la pulpe dentaire (Fig. 3B), pour occuper l'ensemble de la pulpe dentaire après 7 jours d'implantation (Fig. 3C). Après 2 semaines, les odontoblastes et les améloblastes sont devenus fonctionnels et sécrètent la dentine et l'émail respectivement (Fig. 3D). Les racines, les tissus de soutien et os alvéolaire commencent à se former (Fig. 3D), ce qui ne se produit pas dans nos conditions *in vitro*.

Après 8 jours de culture, les réassociations entre cellules épithéliales et cellules mésenchymateuses, atteignent le stade de cloche précoce (Fig. 2H). La possibilité de la revascularisation a été examinée sur les cultures de germes dentaires et de réassociations après implantation chez des souris ICR adultes.

Après 2 jours d'implantation, les vaisseaux sanguins sont présents uniquement dans les tissus périimplantaires (résultats non présentés). Après 4 jours les vaisseaux sanguins persistent dans

le tissu périimplantaire, sans atteindre ni la pulpe dentaire, ni l'organe de l'émail (Fig. 3E). Après 7 jours, CD31 a été détecté dans l'ensemble de la pulpe dentaire et dans l'organe de l'émail (Fig. 3F). Après 2 semaines, une épaisse couche de dentine a été déposée et l'émail a été sécrété et commencent à se minéraliser (Fig. 3G). Les racines, les tissus de soutien et de l'os associé commencent à se former (Fig. 3D). Cela ne se produit pas dans nos conditions *in vitro* (Hu et al., 2006).

## DISCUSSION

Depuis les années 1950, de nombreux travaux ont été consacrés à l'étude de la vascularisation au cours de l'odontogenèse, (Yoshida et Ohshima, 1996 ; Kat et coll., 2003 ; Manzke et coll., 2005), à l'étude de la revascularisation des dents transplantées (Carlile, 1998) et enfin, à l'étude de la revascularisation des germes dentaires implantés après culture *in vitro*. La plupart des résultats obtenus proviennent d'observations histologiques, en microscopie électronique à balayage et/ou à transmission. Plus récemment, des marqueurs spécifiques pour les cellules endothéliales sont devenus disponibles pour étudier la formation et la fonction des vaisseaux sanguins.

### Importance de la vascularisation dans la formation de l'émail

Au stade de cloche tardive (E18) (Nait Lechguer et coll., 2008), les vaisseaux sanguins viennent au contact de la membrane basale associée à l'épithélium dentaire externe (EDE) et progressivement pénètrent dans l'organe de l'émail. A ce stade, BMP-2, qui est un stimulateur de formation vasculaire, a été détecté dans le stratum intermedium (SI) (Nadiri et coll., 2004; Aida et coll., 2005). Il a été montré que BMP-2 induit la différenciation des améloblastes *in vitro* (Coin et coll., 1999). De plus, BMP-2 et BMP-4 ont été détectées au pôle basal des préaméloblastes juste avant leur différenciation (E19/P0) (Nadiri et coll., 2004). Ces protéines pourraient donc être impliquées *in vivo* dans la différenciation des améloblastes. Cependant, l'immunolocalisation de BMP-2 n'a montré aucun stockage de cette dernière au niveau de la jonction épithélio-mésenchymateuse dans les régions où les préaméloblastes avaient commencé à se différencier. En outre, il n'y a aucune évidence de la présence de BMP-2 dans l'émail (Smith et Lesot, 2001). L'hybridation *in situ* a prouvé que *Bmp-2* n'est pas exprimé par des préaméloblasts mais seulement plus tard par les améloblastes fonctionnels (Bègue-Kirn et coll., 1994). Ceci soulève la question du rôle de cette protéine à un stade si tardif. Plus récemment, il a été démontré que BMP-2 peut être transportée et/ou sécrétée par les cellules endothéliales (Langenfeld et Langenfeld, 2004 ; Csiszar et coll., 2005). Le réseau vasculaire présent dans l'organe de l'émail pourrait par conséquent être indispensable à l'apport de BMP-2 nécessaire pour l'amélogénèse. D'autres investigations seront nécessaires pour tester cette hypothèse.

Il a été suggéré que le transport de calcium du sang vers l'émail est important pour la minéralisation des tissus dentaires (Woltgens et coll., 1995 ; Kawamoto et Shimizu 1997). Ainsi ce développement rapide des vaisseaux sanguins au stade de cloche tardive dans l'organe de l'émail permettrait d'accomplir cette fonction (Nait Lechguer et coll., 2008). Dans les germes dentaires cultivés, les vaisseaux sanguins sont absents de l'organe de l'émail. Bien que les améloblastes se polarisent et sécrètent les protéines de l'émail, le dépôt de la matrice d'émail *in vitro* exige un milieu de culture spécifique (Boukari et Ruch, 1981 ; Sakakura et coll., 1989). Quand le calcium est ajouté dans le milieu de culture, la sécrétion et la minéralisation de l'émail peuvent se produire même en l'absence de sérum (Bringas et coll., 1987). *In vivo*, les vaisseaux sanguins de l'organe d'émail sont impliqués dans le transport du calcium : Sakakura et coll. (1989) ont validé ce concept en étudiant les effets de la calcitonine et de l'hormone parathyroïdienne circulante, sur l'odontogenèse *in vitro*, en utilisant le dépôt de matrice d'émail comme paramètre d'évaluation.

### **Importance de la revascularisation pour l'ingénierie tissulaire dentaire**

Dans les cultures des germes de molaires intactes (GM14) et de réassociations (R14), nous avons mis en évidence par immunolocalisation de CD31 que les structures vasculaires peuvent être maintenues *in vitro* pendant au moins 2 semaines. Aucune différence entre ces deux types de cultures n'a été observée en terme de localisation des structures vasculaires. En comparaison avec les germes dentaires *in vivo*, les vaisseaux sanguins n'ont jamais été détectés ni dans la pulpe dentaire ni dans l'organe de l'émail d'ébauches dentaires cultivées. Lorsque des ébauches dentaires prélevées au stade de cloche précoce (GM16) sont mises en culture, il n'y a aucun signe de croissance vasculaire qui accompagne le développement de ces cultures. L'absence de vascularisation des dents cultivées devrait avoir des conséquences sur leur métabolisme. En particulier, elle pourrait expliquer la petite taille des dents cultivées par rapport à la taille des dents *in vivo*. Ahmad et Ruch (1987) ont montré que la croissance des germes dentaires *in vitro* était réduite, du fait du rallongement du cycle cellulaire *in vitro* du aux facteurs présents dans le sérum. Puisque la taille finale des organes cultivés est un paramètre important, le développement des vaisseaux sanguins est un point critique à prendre en compte pour mettre au point nos techniques d'ingénierie tissulaire dentaire.

Les germes de molaires intactes et les réassociations cultivées ont été implantés chez les souris adultes. Bien que rien n'ait été fait pour stimuler la vascularisation (absence de facteurs de croissance exogènes), tous les compartiments dentaires (pulpe dentaire et organe de l'émail) sont revascularisés. La même densité de vascularisation a été observée dans les molaires *ex vivo*, dans les germes dentaires et les réassociations implantées à un stade analogue (Nait Lechguer et coll., 2008). La seule différence observée est que la revascularisation progresse plus rapidement dans les implants de germes de molaires intacts cultivés que dans les implants de réassociations cultivées. Cela pourrait être une conséquence de la dissociation des tissus dentaires en cellules avant la mise en culture.

## CONCLUSION

Les résultats de cette étude confirment qu'il est possible de reproduire le développement de la couronne dentaire *in vitro* à partir des réassociations entre cellules épithéliales et cellules mésenchymateuses dentaires, incluant les différentes étapes de l'histogenèse épithéliale, de la morphogenèse et des cytodifférenciations. Cependant, le développement de la vascularisation s'avère impossible *in vitro*. L'implantation des réassociations cultivées est rapidement suivie de la vascularisation de l'ensemble de l'implant : pulpe dentaire et organe de l'émail.

L'implication de VEGF, BMPs et FGFs dans la régulation des activités cellulaires dentaires telles que la prolifération cellulaire, la différenciation et/ou l'apoptose est largement documentée (Vainio et coll., 1991 ; Vaahtokari et coll., 1996 ; Nadiri et coll., 2004). Les travaux de Nadiri et coll. (2004) ont permis de localiser BMP-2, BMP-4 et FGF-4 au cours du développement de la première molaire inférieure chez la souris. En comparaison, nos résultats semblent montrer une certaine similitude spatio-temporelle entre la présence de ces facteurs de croissance dans le germe dentaire et la mise en place des vaisseaux sanguins. D'autres travaux ont démontré que ces facteurs de croissance participent au développement de la vascularisation dans d'autres organes et tissus. Ainsi FGF-4 possède une action angiogénique (Basilico et Mascoteli, 1992 ; Rissanen et coll., 2002), induit la production de VEGF par les cellules endothéliales (Deroanne et coll., 1997) et stimule l'expression du gène *Bmp-4* (Holleville et coll., 2003). BMP-4 régule l'expression des gènes *Vegf* et *flk-1* (gène codant pour le récepteur VEGFR2) (He et Chen, 2005) et BMP-2 possède une action angiogénique (Langenfeld et Langenfeld, 2004).

L'ensemble de ces résultats nous conduit à faire l'hypothèse qu'il existe un lien entre la mise en place des vaisseaux sanguins, la présence des BMPs et FGFs dans le germe dentaire au cours du développement. Il conviendra de compléter ces travaux par l'étude des rôles de chacune de ces protéines dans la mise en place de la vascularisation au cours du développement dentaire *in vivo* et rechercher leur présence dans les cultures des réassociations *in vitro*.

L'ensemble de ces données permettra une meilleure compréhension des mécanismes gouvernant le développement dentaire et sont susceptibles d'être utilisées pour développer une nouvelle stratégie d'ingénierie tissulaire dentaire.

## II. RÉFÉRENCES

- AHMAD N, RUCH JV. Comparison of growth and cell proliferation kinetics during mouse molar odontogenesis *in vivo* and *in vitro*. *Cell Tissue Kinet.* (1987) 20,319-329.
- AIDA M, IRIE T, AIDA T, TACHIKAWA T. Expression of protein kinases C betaI, betaII, and VEGF during the differentiation of enamel epithelium in tooth development. *J Dent Res.* (2005) 84,234-239.
- BASILICO C, MOSCATELLI D. The FGF family of growth factors and oncogenes. *Adv Cancer Res.* (1992) 59,115-165.
- BEGUE-KIRN C, SMITH AJ, LORIOT M, KUPFERLE C, RUCH JV, LESOT H. Comparative analysis of TGF beta s, BMPs, IGF1, msxs, fibronectin, osteonectin and bone sialoprotein gene expression during normal and *in vitro*-induced odontoblast differentiation. *Int J Dev Biol.* (1994) 38,405-420.
- BOUKARI A, RUCH JV. Behavior of embryonic mouse teeth *in vitro*: preservation of the crown pattern and mineralization. *J Biol Buccale.* (1981) 9,349-361.
- BRINGAS P, NAKAMURA M, NAKAMURA E, EVANS J, SLAVKIN HC. Ultrastructural analysis of enamel formation during *in vitro* development using chemically-defined medium. *Scanning Microsc.* (1987) 1,1103-1108.
- CARLILE MJ, HARRISON VT, LUMSDEN AG, PALMER RM. Development and cell fate in interspecific (*Mus musculus*/*Mus caroli*) orthotopic transplants of mouse molar tooth germs detected by *in situ* hybridization. *Arch Oral Biol.* (1998) 43,395-406.
- CEBE-SUAREZ S, ZEHNDER-FJALLMAN A, BALLMER-HOFER K. The role of VEGF receptors in angiogenesis; complex partnerships. *Cell Mol Life Sci.* (2006) 63,601-615.
- CSISZAR A, SMITH K.E, KOLLER A, KALEY G, EDWARDS J.G, UNGVARI Z. Regulation of bone morphogenetic protein-2 expression in endothelial cells: role of nuclear factor-kappaB activation by tumor necrosis factor-alpha, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, and high intravascular pressure. *Circulation.* (2005) 111,2364-2372.
- DEROANNE CF, HAJITOU A, CALBERG-BACQ CM, NUSGENS BV, LAPIÈRE CM. Angiogenesis by fibroblast growth factor 4 is mediated through an autocrine up-regulation of vascular endothelial growth factor expression. *Cancer Res.* (1997) 57,5590-5597.
- HE C, CHEN X. Transcription regulation of the *veg*f gene by the BMP/Smad pathway in the angioblast of zebrafish embryos. *Biochem Biophys Res Commun.* (2005) 329,324-330.

HOLLEVILLE N, QUILHAC A, BONTOUX M, MONSORO-BURQ AH. BMP signals regulate Dlx5 during early avian skull development. *Dev Biol.* (2003) 257,177-89.

HU B, NADIRI A, BOPP-KUCHLER S, PERRIN-SCHMITT F, PETERS H, LESOT H. Tissue Engineering of Tooth Crown, Root and Periodontium. *Tissue Eng.* (2006) 12,2062-2075.

ILAN N, MADRI JA. PECAM-1: old friend, new partners. *Curr Opin Cell Biol.* (2003) 15,515-524.

KAT PS, SAMPSON WJ, WILSON DF, WIEBKIN OW. Distribution of the epithelial rests of Malassez and their relationship to blood vessels of the periodontal ligament during rat tooth development. *Aust Orthod J.* (2003) 19,77-86.

KAWAMOTO T, SHIMIZU M. Pathway and speed of calcium movement from blood to mineralizing enamel. *J Histochem Cytochem.* (1997) 45,213-230.

LANGENFELD EM, LANGENFELD J. Bone morphogenetic protein-2 stimulates angiogenesis in developing tumors. *Mol Cancer Res.* (2004) 2,141-149.

MANZKE E, KATCHBURIAN E, FARIA FP, FREYMU E. Structural features of forming and developing blood capillaries of the enamel organ of rat molar tooth germs observed by light and electron microscopy. *Journal of Morphology.* (2005) 265,335–342.

NADIRI A, KUCHLER-BOPP S, HAIKEL Y, LESOT H. Immunolocalization of BMP-2/-4, FGF-4, and WNT10b in the developing mouse first lower molar. *J Histochem Cytochem.* (2004) 52,103-112.

NAIT LECHGUER A., KUCHLER-BOPP S., HU B., HAIKEL Y. AND LESOT H. Tooth tissue engineering: kinetic of vascularization. *J. Dental Research.* (2008) 87,1138-1143.

NAIT LECHGUER A, KUCHLER-BOPP S, HU B AND LESOT H. Crown formation during tooth development and tissue engineering. *European Cells and Materials* (2007) 14,53.

NAIT LECHGUER A, KUCHLER-BOPP S, AND LESOT H. Crown formation during tooth development and tissue engineering. *J Exp Zoolog.* (2009) sous presse.

RISSANEN TT, MARKKANEN JE, ARVE K, RUTANEN J, KETTUNEN MI, VAJANTO I, JAUHAINEN S, CASHION L, GRUCHALA M, NARVANEN O, TAIPALE P, KAUPPINEN RA, RUBANYI GM, YLA-HERTTUALA S. Fibroblast growth factor 4 induces vascular permeability, angiogenesis and arteriogenesis in a rabbit hindlimb ischemia model. *FASEB J.* (2003) 17,100-102.

SAKAKURA Y, FUJIWARA N, SUGAWARA M, NAWA T. In vitro effects of calcitonin and/or parathyroid hormone on odontogenesis of mouse embryonic molars. *J Dent Res.* (1989) 68,1279-1284.

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) 12,425-437.

THISSE C, ZON LI. Organogenesis--heart and blood formation from the zebrafish point of view. *Science*. (2002) 295,457-462.

VAAHTOKARI A, ABERG T, THESLEFF I. Apoptosis in the developing tooth: association with an embryonic signaling center and suppression by EGF and FGF-4. *Development*. (1996) 122,121-129.

VAINIO S, KARAVANOVA I, JOWETT A, THESLEFF I. Identification of BMP-4 as a signal mediating secondary induction between epithelial and mesenchymal tissues during early tooth development. *Cell*. (1993) 75,45-58.

WOLTGENS JH, LYARUU DM, BRONCKERS AL, BERVOETS TJ, VAN DUIN M. Biomineralization during early stages of the developing tooth in vitro with special reference to secretory stage of amelogenesis. *Int J Dev Biol*. (1995) 39,203-212.

YOSHIDA S, OHSHIMA H. Distribution and organization of peripheral capillaries in dental pulp and their relationship to odontoblasts. *Anat Rec*. (1996) 245,313-326.



## Légendes des figures

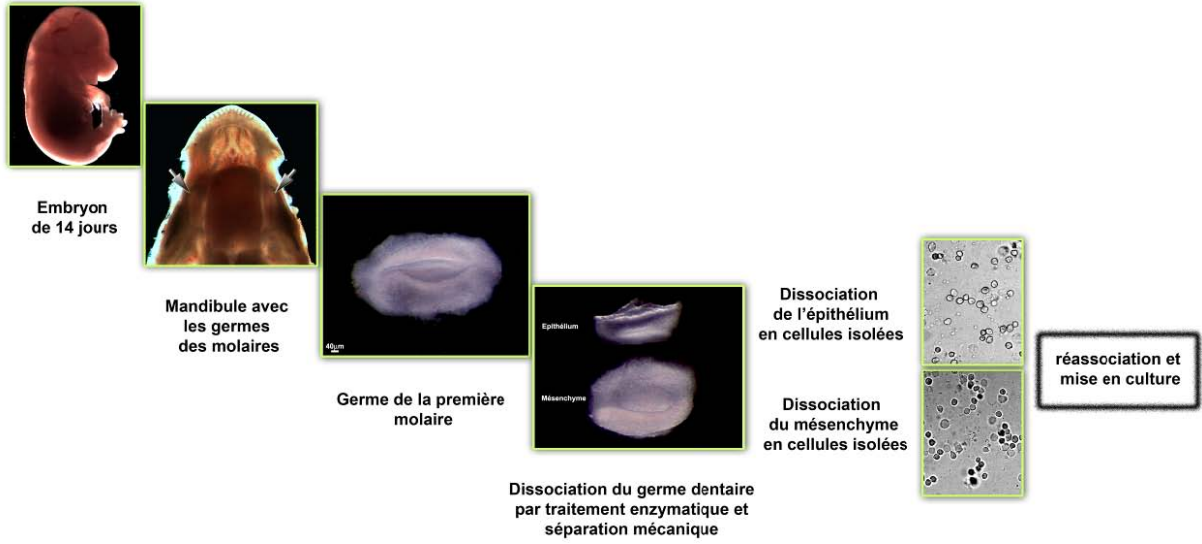
### Figure 1 : Prélèvement des germes dentaires et dissociations tissulaires

**Figure 2 : Mise en évidence des vaisseaux sanguins dans les germes de molaires intactes cultivées (GM14 : A-D, GM16 : E-H) et dans les réassociations cultivées (R14 : I-K).** Les vaisseaux sanguins sont détectés par immunolocalisation de CD31 et du collagène IV (B-D, F-H et K) sur des coupes à congélation de 7  $\mu\text{m}$  et en histologie (A, E et I-J) sur des coupes paraffine de 5  $\mu\text{m}$ .

ED, épithélium dentaire ; MD, mésenchyme dentaire ; MP, mésenchyme périodontaire ; OE, organe de l'émail. Barres = 40  $\mu\text{m}$ .

**Figure 3 : Revascularisation des germes de molaires intactes (A-D) et des réassociations (E-G) implantés en sous-cutané chez la souris ICR adulte.** Après 6 jours de culture *in vitro*, les germes de molaires intactes sont implantés pour 2 jours (A), 4 jours (B), 7 jours (C) et 2 semaines (D). Après 8 jours de culture *in vitro*, les réassociations sont implantées pendant 4 jours (E), 7 jours (F) et 2 semaines (G). Les vaisseaux sanguins sont détectés par immunolocalisation de CD31 et du collagène IV (A-C et E-F) sur des coupes à congélation de 7  $\mu\text{m}$  et en histologie (D et G) sur des coupes paraffine de 5  $\mu\text{m}$ .

OE, organe de l'émail ; PD, pulpe dentaire ; VS, vaisseau sanguin. Barres = 40  $\mu\text{m}$ .



**Figure 1**

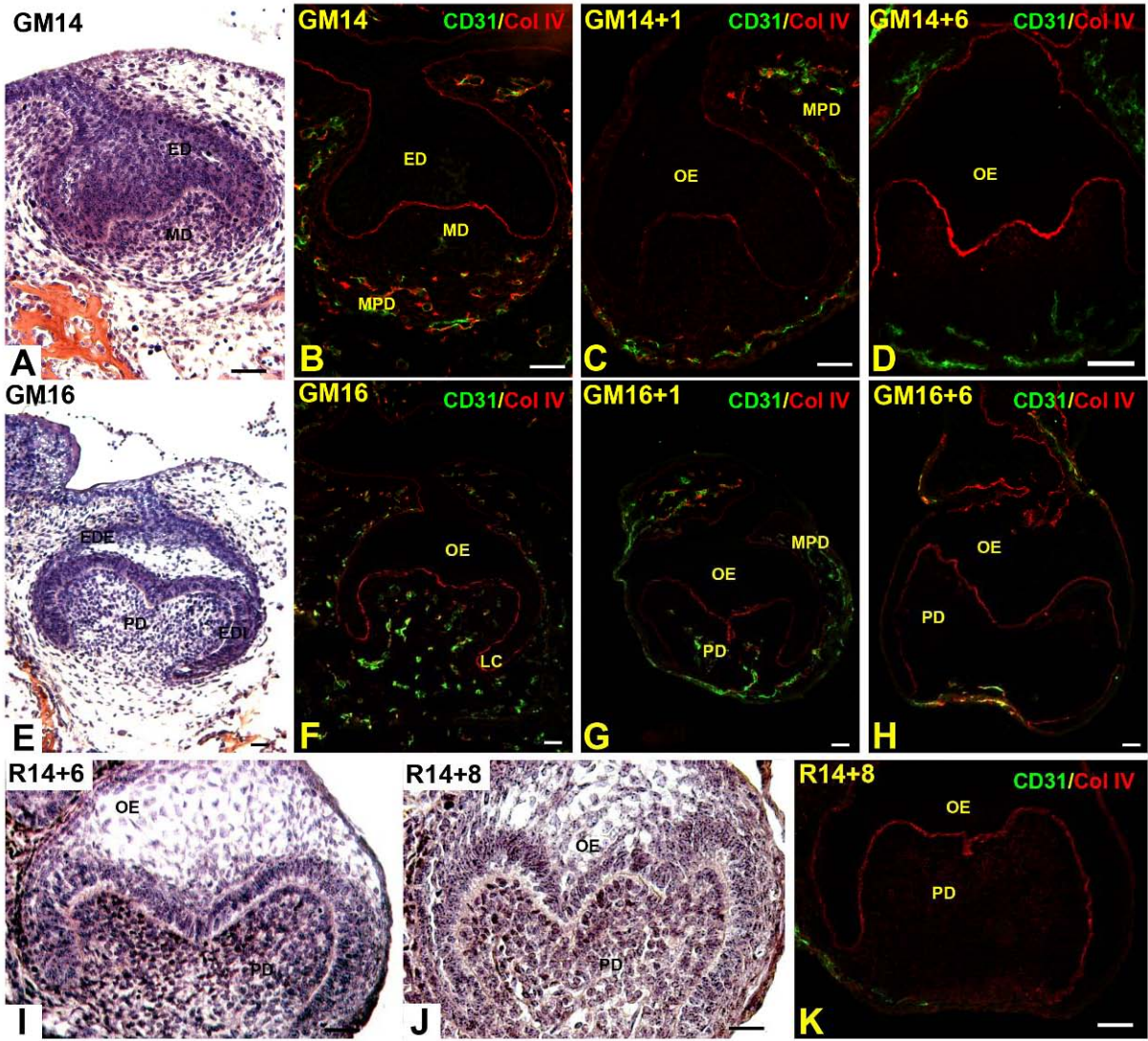


Figure 2

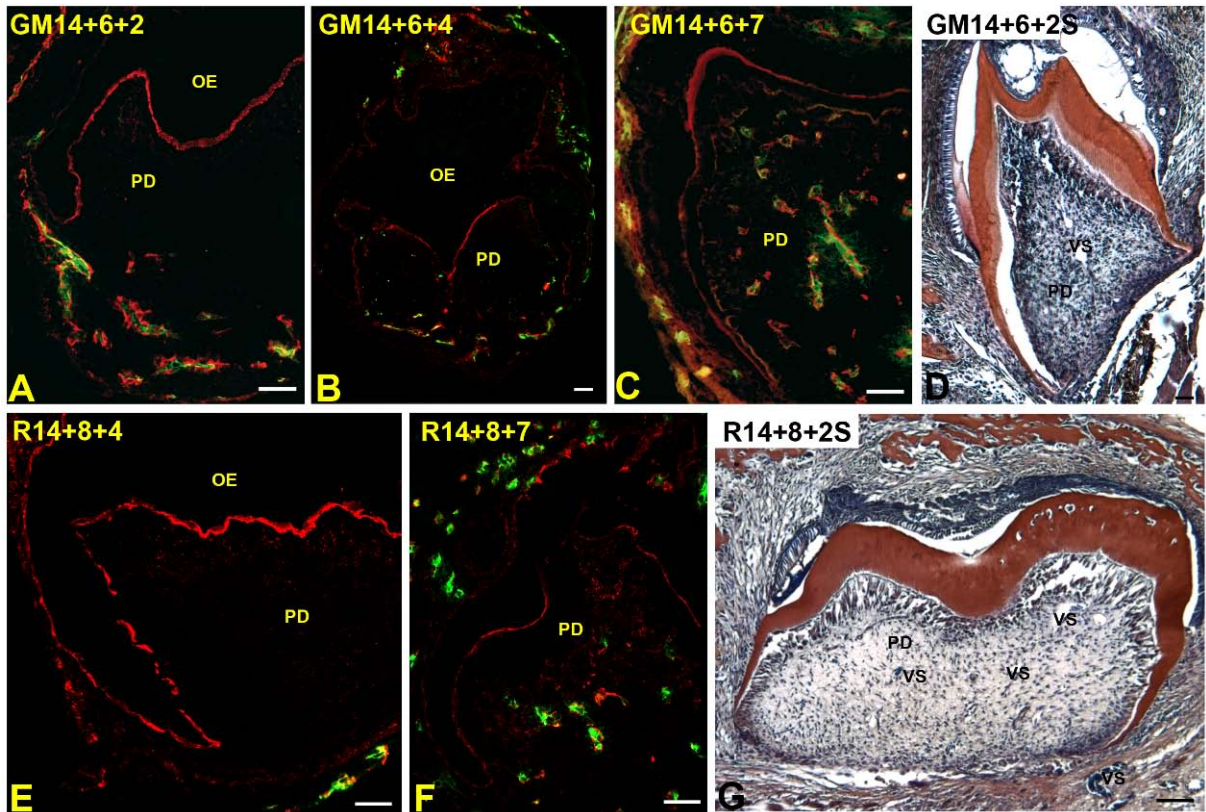


Figure 3

## **VII REFERENCES**

- **Ahmad N, Ruch JV.** Comparison of growth and cell proliferation kinetics during mouse molar odontogenesis in vivo and in vitro. *Cell Tissue Kinet.* 1987; 20:319-29.
- **Aida M, Irie T, Aida T, Tachikawa T.** Expression of protein kinases C betaI, betaII, and VEGF during the differentiation of enamel epithelium in tooth development. *J Dent Res.* 2005; 84:234-9.
- **Arends J, Jongbloed WL.** Ultrastructural studies of synthetic apatite crystals. *J Dent Res* 1979; 58:837-42 (B).
- **Atala A.** Engineering organs. *Curr Opin Biotechnol.* 2009; 20:575-92
- **Austin TW, Lagasse E.** Hepatic regeneration from hematopoietic stem cells. *Mech Dev.* 2003; 120:131-5.
- **Bachoud-Lévi A, Bourdet C, Brugières P, Nguyen JP, Grandmougin T, Haddad B, Jény R, Bartolomeo P, Boissé MF, Barba GD, Degos JD, Ergis AM, Lefaucheur JP, Lisovoski F, Pailhous E, Rémy P, Palfi S, Defer GL, Cesaro P, Hantraye P, Peschanski M.** Safety and tolerability assessment of intrastriatal neural allografts in five patients with Huntington's disease. *Exp Neurol.* 2000; 161:194-202.
- **Bachoud-Levi A, Bourdet C, Brugieres P.** Safety and tolerability assessment of intrastriatal neural allografts in five patients with Huntington's disease. *Exp Neurol* 2000; 161:194-202.
- **Barker DM, Beck CW.** Overexpression of the transcription factor Msx1 is insufficient to drive complete regeneration of refractory stage *Xenopus laevis* hindlimbs. *Dev Dyn.* 2009; 238:1366-78.
- **Bartlett JD, Ganss B, Goldberg M, Moradian-Oldak J, Paine ML, Snead ML, et al.** Protein-protein interactions of developing enamel matrix. *Curr Top Dev Biol* 2006; 74:57-115.
- **Basilico C, Moscatelli D.** The FGF family of growth factors and oncogenes. *Adv Cancer Res.* 1992; 59:115-65.

- **Begue-Kirn C, Smith AJ, Lorient M, Kupferle C, Ruch JV, Lesot H.** Comparative analysis of TGF beta s, BMPs, IGF1, msxs, fibronectin, osteonectin and bone sialoprotein gene expression during normal and in vitro-induced odontoblast differentiation. *Int J Dev Biol.* 1994; 38:405-20.
- **Bègue-Kirn C, Smith AJ, Ruch JV, Wozney JM, Purchio A, Hartmann D, Lesot H.** Effects of dentin proteins, transforming growth factor beta 1 (TGF beta 1) and bone morphogenetic protein 2 (BMP2) on the differentiation of odontoblast in vitro. *Int J Dev Biol.* 1992; 36:491-503.
- **Bluteau G, Luder HU, De Bari C, Mitsiadis TA.** Stem cells for tooth engineering. *Eur Cell Mater.* 2008; 16:1-9
- **Bonnaud A.** Cellular changes at the level of the outer enamel epithelium during vascularization of the enamel organ in the rat. *J Biol Buccale.* 1984; 12:225-37.
- **Bosshardt DD.** Are cementoblasts a subpopulation of osteoblasts or a unique phenotype? *J Dent Res.* 2005; 84:390-406.
- **Boukari A, Ruch JV.** [Behavior of embryonic mouse teeth in vitro: preservation of the crown pattern and mineralization] *J Biol Buccale.* 1981; 9:349-61.
- **Bouletreau PJ, Warren SM, Spector JA, Peled ZM, Gerrets RP, Greenwald JA, Longaker MT.** Hypoxia and VEGF up-regulate BMP-2 mRNA and protein expression in microvascular endothelial cells: implications for fracture healing. *Plast Reconstr Surg.* 2002; 109:2384-97.
- **Bringas PJ, Nakamura M, Nakamura E, Evans J, Slavkin HC.** Ultrastructural analysis of enamel formation during in vitro development using chemically-defined medium. *Scanning Microsc.* 1987; 1:1103-8.
- **Byers MR, Kvinnsland I, Bothwell M.** Analysis of low affinity nerve growth factor receptor during pulpal healing and regeneration of myelinated and unmyelinated axons in replanted teeth. *J Comp Neurol.* 1992; 15:470-84.
- **Byers MR, Närhi MV.** Dental injury models: experimental tools for understanding neuroinflammatory interactions and polymodal nociceptor functions. *Crit Rev Oral Biol Med.* 1999; 10:4-39.

- **Byers MR, Suzuki H, Maeda T.** Dental neuroplasticity, neuro-pulpal interactions, and nerve regeneration. *Microsc Res Tech.* 2003; 6:503-15.
- **Cam Y, Neumann MR, Ruch JV.** 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.* 1990; 35:813-822.
- **Carlile MJ, Harrison VT, Lumsden AG, Palmer RM.** Development and cell fate in interspecific (*Mus musculus/Mus caroli*) orthotopic transplants of mouse molar tooth germs detected by in situ hybridization. *Arch Oral Biol.* 1998; 43:395-406.
- **Carmeliet P.** Angiogenesis in life, disease and medicine. *Nature*, 2005; 438: 932-936.
- **Carmeliet, P.** Angiogenesis in health and disease. *Nature Med*, 2003; 9: 653–660.
- **Cebe-Suarez S, Zehnder-Fjallman A, Ballmer-Hofer K.** The role of VEGF receptors in angiogenesis; complex partnerships. *Cell Mol Life Sci.* 2006; 63:601-15.
- **Cerri PS, Faria FP, Villa RG, Katchburian E.** Light microscopy and computer three-dimensional reconstruction of the blood capillaries of the enamel organ of rat molar tooth germs. *J Anat*, 2004; 204: 191–195.
- **Coin R, Kieffer S, Lesot H, Vonesch JL, Ruch JV.** Inhibition of apoptosis in the primary enamel knot does not affect specific tooth crown morphogenesis in the mouse. *Int J Dev Biol*, 2000; 44:389-96.
- **Coin R, Lesot H, Vonesch J.L, Haïkel Y, Ruch JV.** Aspect of cell proliferation kinetics of the inner dental epithelium durring mouse molar and incisor morphogenesis a reappraisal of the role of the enamel knot area. *Int.J.Dev.Bio*, 1999; 43:261-267.
- **Coultas L, Chawengsaksophak K, Rossant J.** Endothelial cells and VEGF in vascular development. *Nature*, 2005; 438:937-945.
- **Csiszar A, Smith KE, Koller A, Kaley G, Edwards JG, Ungvari Z.** Regulation of bone morphogenetic protein-2 expression in endothelial cells: role of nuclear factor-kappaB activation by tumor necrosis factor-alpha, H2O2, and high intravascular pressure. *Circulation.* 2005; 111:2364-72.



- **Diekwisch TG.** The developmental biology of cementum. *Int J Dev Biol.* 2001; 45:695-706.
- **D'Souza RN, Aberg T, Gaikwad J, Cavender A, Owen M, Karsenty G, Thesleff I.** Cbfa1 is required for epithelial-mesenchymal interactions regulating tooth development in mice. *Development* 1999; 126:2911-2920.
- **Duailibi MT, Duailibi SE, Young C.S, Bartlett JD, Vacanti JP, Yelick PC.** Bioengineered teeth from cultured rat tooth bud cells. *J Dent Res.* 2004; 83:523-8.
- **Duailibi SE, Duailibi MT, Zhang W, Asrican R, Vacanti JP, Yelick PC.** Bioengineered dental tissues grown in the rat jaw. *J Dent Res.* 2008; 87:745-50.
- **Dvorak HF.** Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor: a critical cytokine in tumor angiogenesis and a potential target for diagnosis and therapy. *J Clin Oncol.* 2002; 20:4368-80.
- **Elhabazi A, Marie-Cardine A, Chabbert-de Ponnat I, Bensussan A, Boumsell L.** Structure and function of the immune semaphorin CD100/SEMA4D. *Crit Rev Immunol.* 2003; 23:65-81.
- **Fincham AG, Bessem CC, Bringas P.J, Hu YY, Snead ML, Slavkin HC.** Amelogenesis in vitro: a model for studies of epithelial postsecretory processing during tissue-specific extracellular matrix biomineralization. *Differentiation.* 1989; 41:62-71.
- **Fincham AG, Moradian-Oldak J, Simmer JP.** The structural biology of the developing dental enamel matrix. *J Struct Biol* 1999; 126:270-99.
- **Fouillard L, Bensidhoum M, Bories D, Bonte H, Lopez M, Moseley AM, Smith A, Lesage S, Beaujean F, Thierry D, Gourmelon P, Najman A, Gorin NC.** Engraftment of allogeneic mesenchymal stem cells in the bone marrow of a patient with severe idiopathic aplastic anemia improves stroma. *Leukemia.* 2003; 17:474-6.
- **Fouillard L, Chapel A, Bories D, Bouchet S, Costa JM, Rouard H, Hervé P, Gourmelon P, Thierry D, Lopez M, Gorin NC.** Infusion of allogeneic-related HLA mismatched mesenchymal stem cells for the treatment of incomplete engraftment

following autologous haematopoietic stem cell transplantation. *Leukemia*. 2007; 21:568-70.

- **Fried K, Lillesaar C, Sime W, Kaukua N, Patarroyo M.** Target finding of pain nerve fibers: neural growth mechanisms in the tooth pulp. *Physiol Behav*. 2007; 92:40-5.
- **Fried K, Nosrat C, Lillesaar C, Hildebrand C.** Molecular signaling and pulpal nerve development. *Crit Rev Oral Biol Med*. 2000; 11:318-32.
- **Fujiwara K.** Platelet endothelial cell adhesion molecule-1 and mechanotransduction in vascular endothelial cells. *J Intern Med*. 2006; 259:373-80.
- **Goldberg M, Septier D.** A comparative study of the transition between predentin and dentin using various preparative procedures in the rat. *Eur J Oral Sci* 1996; 104:269-77.
- **Gritli-Linde A, Bei M, Maas R, Zhang X.M, Linde A, McMahon A.P.** Shh signaling within the dental epithelium is necessary for cell proliferation, growth and polarization. *Development*, 2002; 129: 5323-37.
- **Gronthos S, Mankani M, Brahim J, Robey PG and Shi S** Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) *in vitro* and *in vivo*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2000; 97 :13625.
- **Grothos S, Mankani M, Brahim J, Robey PG, Shi S.** Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) *in vitro* and *in vivo*. *Proc Nat Acad Sci U S A* 2000; 97:13625-13630.
- **Grove JE, Bruscia E, Krause DS.** Plasticity of bone marrowderived stem cells. *Stem Cells*. 2004; 22:487-500.
- **Hammer H.** Replantation and implantation of teeth. *Int Dent J*. 1955; 5:439-457.
- **Haynesworth SE, Goshima J, Goldberg VM, Caplan AI.** Characterization of cells with osteogenic potential from human marrow. *Bone*. 1992; 13:81-8.

- **He C, Chen X.** Transcription regulation of the vegf gene by the BMP/Smad pathway in the angioblast of zebrafish embryos. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005; 329:324-30.
- **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; 116:324-33.
- **Hildebrand C, Fried K, Tuisku F, Johansson CS.** Teeth and tooth nerves. *Prog Neurobiol.* 1995; 45:165-222.
- **Hoffman RL.** Formation of Periodontal Tissues around Subcutaneously Transplanted Hamster Molars. *J Dent Res.* 1960; 781-798.
- **Honda MJ, Sumita Y, Kagami H, Ueda M.** Histological and immunohistochemical studies of tissue engineered odontogenesis. *Arch Histol Cytol.* 2005; 68:89-101.
- **Hu B, Nadiri A, Bopp-Kuchler S, Perrin-Schmitt F, Lesot H.** Dental Epithelial Histomorphogenesis in vitro *J. Dent.Res.* 2005 a; 84:521-525.
- **Hu B, Nadiri A, Bopp-Kuchler S, Perrin-Schmitt F, Peters H, Lesot H.** Tissue Engineering of Tooth Crown, Root and Periodontium. *Tissue Eng.* 2006 a; 12:2069-75.
- **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 b; 50:131-6.
- **Hu B, Unda F, Bopp-Kuchler S, Jimenez L, Wang X.J, Haïkel Y, Wang SL, Lesot H.** Bone Marrow Cells Can Give Rise to Ameloblast-like Cells. *J Dent Res.* 2006 b, 85:416-21.
- **Ikeda E, Morita R, Nakao K, Ishida K, Nakamura T, Takano-Yamamoto T, Ogawa M, Mizuno M, Kasugai S, Tsuji T.** Fully functional bioengineered tooth replacement as an organ replacement therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009; 106:13475-80.

- **Ilan N, Madri JA.** PECAM-1: old friend, new partners. *Curr Opin Cell Biol.* 2003; 15 : 515-524.
- **Jernvall J, Aberg T, Kettunen P, Keranen S, Thesleff I.** The life history of an embryonic signaling center: BMP-4 induces p21 and is associated with apoptosis in the mouse tooth enamel knot. *Development.* 1998; 125:161-9.
- **Jernvall J, Kettunen P, Karavanova I, Martin LB, Thesleff I.** 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.* 1994; 38:463-9.
- **Jernvall J, Thesleff I.** Reiterative signaling and patterning during mammalian tooth morphogenesis. *Mech Dev.* 2000; 92:19-29.
- **Johnson DS, Burich RL.** Revascularization of reimplanted teeth in dogs. *J Dent Res.* 1979; 58:671.
- **Jontell M, Okijt T, Dahlgren U, Bergenholtz G.** Immune defense mechanisms of the dental pulp. *Crit Rev Oral Biol Med.* 1998; 9:179-200.
- **Josephsen K, Fejerskov O, Theilade J.** Age changes in juxtaodontoblastic capillaries of rat molars. *Scand J Dent Res.* 1974; 82:574-8.
- **Karcher-Djuricic V, Staubli A, Meyer JM, Ruch JV.** Acellular dental matrices promote functional differentiation of ameloblasts. *Differentiation.* 1985; 29:169-75.
- **Kat PS, Sampson WJ, Wilson DF, Wiebkin OW.** Distribution of the epithelial rests of Malassez and their relationship to blood vessels of the periodontal ligament during rat tooth development. *Aust Orthod J.* 2003; 19:77-86.
- **Katritsis DG, Sotiropoulou PA, Karvouni E, Karabinos I, Korovesis S, Perez SA, Vouridis EM, Papamichail M.** Transcoronary transplantation of autologous mesenchymal stem cells and endothelial progenitors into infarcted human myocardium. *Catheter Cardiovasc Interv.* 2005; 65:321-9.
- **Kawamoto T, Shimizu M.** Pathway and speed of calcium movement from blood to mineralizing enamel. *J Histochem Cytochem.* 1997; 45:213-30.

- **Keranen SV, Aberg T, Kettunen P, Thesleff I, Jernvall J.** Association of developmental regulatory genes with the development of different molar tooth shapes in two species of rodents. *Dev Genes Evol.* 1998; 208: 477-486.
- **Kerebel B, Daculsi G, Kerebel LM.** Ultrastructural studies of enamel crystallites. *J Dent Res* 1979; 58:844-50 (B).
- **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; 132:323-34.
- **Kieffer-Combeau S, Meyer JM, Lesot H.** Cell–matrix interactions and cell–cell junctions during epithelial histomorphogenesis in the developing mouse incisor. *Int J Dev Biol.* 2001; 45:733–742.
- **Kindlova M.** The development of the vascular bed of the marginal periodontium. *J Periodontal Res.* 1970; 5:135-40.
- **Kollar EJ, Baird GR.** Tissue interactions in embryonic mouse tooth germs. II. The inductive role of the dental papilla. *J Embryol Exp Morphol.* 1970; 24:173-86.
- **Kollar EJ, Baird GR.** Tissue interactions in embryonic mouse tooth germs. I. Reorganization of the dental epithelium during tooth-germ reconstruction. *J Embryol Exp Morphol.* 1970; 24:159-71.
- **Kollar EJ, Baird GR.** The influence of the dental papilla on the development of tooth shape in embryonic mouse tooth germs. *J Embryol Exp Morphol.* 1969; 21:131-48.
- **Kollar EJ, Lumsden AG.** Tooth morphogenesis: the role of the innervation during induction and pattern formation. *J Biol Buccale.* 1979; 7:49-60.
- **Kress M, Reeh PW.** More sensory competence for nociceptive neurons in culture. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996; 93:14995-7.
- **Kumanogoh A, Kikutani H.** Semaphorins and their receptors: novel features of neural guidance molecules. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci.* 2010; 86:611-20.

- **Lammert E, Cleaver O, Melton D.** Induction of pancreatic differentiation by signals from blood vessels. *Science*. 2001; 294:564-7.
- **Langenfeld EM, Langenfeld J.** Bone morphogenetic protein-2 stimulates angiogenesis in developing tumors. *Mol Cancer Res*. 2004; 2:141-9.
- **Lariviere RC, Julien JP.** Functions of intermediate filaments in neuronal development and disease. *J Neurobiol*. 2004; 58:131-48.
- **Larson EK, Cahill D, Gorski J, Markus S.** The true dental follicle on premolar eruption in the dog. *Arch. Oral Biol*. 1994; 39: 271-275.
- **Lataillade JJ, Doucet C, Bey E, Carsin H, Huet C, Clairand I, Bottollier-Depois JF, Chapel A, Ernou I, Gourven M, Boutin L, Hayden A, Carcamo C, Buglova E, Joussemet M, de Revel T, Gourmelon P.** New approach to radiation burn treatment by dosimetry-guided surgery combined with autologous mesenchymal stem cell therapy. *Regen Med*. 2007; 2:785-94.
- **Lesot H, Begue-Kirn C, Smith AJ, Fausser JL, Ruch JV.** [Cell-matrix interactions and odontoblast differentiation] *C R Seances Soc Biol Fil*. 1992; 186:485-500.
- **Lesot H, Brook AH.** Epithelial histogenesis during tooth development. *Arch Oral Biol*. 2009; 54 Suppl 1:S25-33.
- **Lesot H, Karcher-Djuricic V, Ruch JV.** Synthesis of collagen type I, type I trimer and type III by embryonic mouse dental epithelial and mesenchymal cells in vitro *Biochim Biophys Acta*. 1981; 656:206-12.
- **Lesot H, Kieffer-Combeau S, Fausser J.L, Meyer J.M, Perrin-Schmitt F, Peterkova R, Peterka M, Ruch J.V.** Cell-cell and cell-matrix interactions during initial enamel organ histomorphogenesis in the mouse. *Connect Tissue Res*. 2002; 43:191-200.
- **Lesot H, Kubler MD, Fausser JL, Ruch JV.** A 165 kDa membrane antigen mediating fibronectin-vinculin interaction is involved in murine odontoblast differentiation. *Differentiation*. 1990; 44:25-35.

- **Lesot H, Osman M, Ruch JV.** Immunofluorescent localization of collagens, fibronectin, and laminin during terminal differentiation of odontoblasts. *Dev Biol.* 1981; 82:371-81.
- **Lesot H, Smith AJ, Matthews JB, Ruch JV.** An extracellular matrix protein of dentine, enamel, and bone shares common antigenic determinants with keratins. *Calcif Tissue Int.* 1988 ; 42:53-7.
- **Lesot H, Vonesch JL, Peterka M, Tureckova J, Peterkova R, Ruch JV.** Mouse molare morphogenesis revisited by three-dimensional reconstruction. II spatial distribution of mitoses and apoptosis in cap to bell stage first and second upper molar teeth. *Int.J.Dev.Bio.* 1996. 40:1017-1031.
- **Lesot, H. and Ruch, J.V.** Characterization of collagen synthesized by embryonic mouse tooth germs. *Biol. Cell.* 1979; 34:23-37.
- **Lillesaar C, Eriksson C, Johansson CS, Fried K, Hildebrand C.** Tooth pulp tissue promotes neurite outgrowth from rat trigeminal ganglia in vitro *J Neurocytol.* 1999; 28:663-70.
- **Lillesaar C, Fried K.** Neurites from trigeminal ganglion explants grown in vitro are repelled or attracted by tooth-related tissues depending on developmental stage. *Neuroscience.* 2004; 125:149-61..
- **Linde A, Goldberg M.** Dentinogenesis. *Crit Rev Oral Biol Med* 1993; 4: 679-728.
- **Lisi S, Peterkova R, Peterka M, Vonesch JL, Ruch JV, Lesot H.** Tooth morphogenesis and pattern of odontoblast differentiation. *Connect Tissue Res.* 2003; 44 Suppl 1:167-70.
- **Loes S, Kettunen P, Kvinnsland H, Luukko K.** Mouse rudimentary diastema tooth primordia are devoid of peripheral nerve fibers. *Anat Embryol (Berl).* 2002; 205:187–191.
- **Lumsden AG, Buchanan JA.** An experimental study of timing and topography of early tooth development in the mouse embryo with an analysis of the role of innervation. *Arch Oral Biol.* 1986; 31:301-11.

- **Lumsden AG, Davies AM.** Chemotropic effect of specific target epithelium in the developing mammalian nervous system. *Nature*. 1986 ; 323(6088):538-9.
- **Lumsden AG, Davies AM.** Earliest sensory nerve fibres are guided to peripheral targets by attractants other than nerve growth factor. *Nature*. 1983; 306:786-8.
- **Luukko K, Hals Kvinnsland I, Kettunen P.I.** Tissue Interactions in the Regulation of Axon Pathfinding During Tooth Morphogenesis. *Dev. Dyn*. 2005; 234: 482–488.
- **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; 42:189–195.
- **Maas R, Bei M.** The genetic control of early tooth development. *Crit Rev Oral Biol Med*. 1997; 8:4-39.
- **Magloire H, Couble ML, Thivichon-Prince B, Maurin JC, Bleicher F.** Odontoblast: a mechano-sensory cell. *J Exp Zool B Mol Dev Evol*. 2009; 312B:416-24.
- **Magloire H, Romeas A, Melin M, Couble ML, Bleicher F, Farges JC.** Molecular regulation of odontoblast activity under dentin injury. *Adv Dent Res*. 2001; 15:46-50.
- **Manzke E, Katchburian E, Faria FP, Freymu E.** Structural features of forming and developing blood capillaries of the enamel organ of rat molar tooth germs observed by light and electron microscopy. *Journal of Morphology*. 2005; 265:335–342.
- **Marks SC Jr, Schroeder HE.** Tooth eruption: theories and facts. *Anat Rec*. 1996; 245:374-93.
- **Marks SC, Cahill DR.** Experimental study in the dog of nonactive role of the tooth in the eruptive process. *Arch. Oral Biol*. 1984; 29: 311-322.
- **Matthews W, Jordan CT, Wiegand GW, Pardoll D, Lemischka IR.** A receptor tyrosine kinase specific to hematopoietic stem and progenitor cell-enriched populations. *Cell*. 1991; 65:1143-1152.



- **Maurin JC, Delorme G, Machuca-Gayet I, Couble ML, Magloire H, Jurdic P, Bleicher F.** Odontoblast expression of semaphorin 7A during innervation of human dentin. *Matrix Biol.* 2005; 24:232-8.
- **Miletich I, Sharpe PT.** Neural crest contribution to mammalian tooth formation. *Birth Defects Res C Embryo Today.* 2004; 72:200-12
- **Mitsiadis TA, Dicou E, Joffre A, Magloire H.** Immunohistochemical localization of nerve growth factor (NGF) and NGF receptor (NGF-R) in the developing first molar tooth of the rat. *Differentiation.* 1992; 49:47-61.
- **Mitsiadis TA, Luukko K.** Neurotrophins in odontogenesis. *Int J Dev Biol.* 1995; 39:195-202.
- **Modino SA, Sharpe PT.** Tissue engineering of teeth using adult stem cells. *Arch Oral Biol.* 2005; 50:255-8.
- **Moser M, Patterson C.** Bone morphogenetic proteins and vascular differentiation: BMPing up vasculogenesis. *Thromb Haemost.* 2005; 94:713-8.
- **Nadiri A, Kuchler-Bopp S, Haikel Y, Lesot H.** Immunolocalization of BMP-2/-4, FGF-4, and WNT10b in the developing mouse first lower molar. *J Histochem Cytochem.* 2004; 52:103-12.
- **Nagai N, Frank RM.** Electron microscopic autoradiography of Ca-45 during dentinogenesis. *Cell Tissue Res.* 1974; 155:513-23.
- **Nguyen BL, Thompson JS, Sharp JG.** Basement membrane components enhance isolated enterocyte growth. *J Surg Res.* 1992 ; 52:510-7.
- **Nichols JE, Cortiella J.** Engineering of a complex organ: progress toward development of a tissue-engineered lung. *Proc Am Thorac Soc.* 2008 ; 15:723-30.
- **Nomi M, Miyake H, Sugita Y, Fujisawa M, Soker S.** Role of growth factors and endothelial cells in therapeutic angiogenesis and tissue engineering. *Curr Stem Cell Res Ther.* 2006; 333-43.

- **Obara N, Lesot H.** Asymmetrical growth, differential cell proliferation, and dynamic cell rearrangement underlie epithelial morphogenesis in mouse molar development. *Cell Tissue Res.* 2007; 330:461-73.
- **Obara N, Lesot H.** Subcellular localization of beta-catenin and cadherin expression in the cap-stage enamel organ of the mouse molar. *Histochem Cell Biol.* 2004 ;121:351-8.
- **Ohazama A, Modino SA, Miletich I, Sharpe P.T.** Stem-cell-based tissue engineering of murine teeth. *J Dent Res.* 2004; 83:518-22.
- **Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, Bodine DM, Leri A, Anversa P.** Transplanted adult bone marrow cells repair myocardial infarcts in mice. *Ann N Y Acad Sci.* 2001;938:221-9; discussion 229-30.
- **Pan M, Naftel JP, Wheeler EF.** Effects of deprivation of neonatal nerve growth factor on the expression of neurotrophin receptors and brain-derived neurotrophic factor by dental pulp afferents of the adult rat. *Arch Oral Biol.* 2000; 45:387-99.
- **Peterkova R, Lesot H, Vonesch JL, Peterka M, Ruch JV.** 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.* 1996; 40:1009-16.
- **Peterkova R, Peterka M, Lesot H.** The developing mouse dentition: a new tool for apoptosis study. *Ann N Y Acad Sci,* 2003; 1010:453-66
- **Peters H, Balling R.** Teeth. Where and how to make them. *Trends Genet.* 1999; 15:59-65.
- **Pispa J, Jung HS, Jernvall J, Kettunen P, Mustonen T, Tabata MJ, Kere J, Thesleff I.** Cusp patterning defect in Tabby mouse teeth and its partial rescue by FGF. *Dev Biol.* 1999; 216:521-34.
- **Pudliszewski M, Pardanaud L.** Vasculogenesis and angiogenesis in the mouse embryo studied using quail/mouse chimeras. *Int J Dev Biol.* 2005; 49:355-61.
- **Pugh, C.W, Ratcliffe, PJ.** Regulation of angiogenesis by hypoxia: role of the HIF system. *Nature. Med.* 2003; 9:677-684.

- **Rissanen TT, Markkanen J.E, Arve K, Rutanen J, Kettunen MI, Vajanto I, Jauhiainen S, Cashion L, Gruchala M, Narvanen O, Taipale P, Kauppinen RA, Rubanyi GM, Yla-Herttuala S.** Fibroblast growth factor 4 induces vascular permeability, angiogenesis and arteriogenesis in a rabbit hindlimb ischemia model. *FASEB J.* 2003; 17:100-2.
- **Robinson C, Briggs HD, Atkinson PJ, Weatherell JA.** Matrix and mineral changes in developing enamel. *J Dent Res* 1979; 58:871-80 (B).
- **Robinson C, Brookes S.J, Shore R.C, Kirkham J.** The developing enamel matrix: nature and function. *Eur J Oral Sci*, 1998; 106 Suppl 1:282-91.
- **Robinson C, Kirkham J, Brookes SJ, Bonass WA, Shore RC.** The chemistry of enamel development. *Int J Dev Biol* 1995; 39:145-152.
- **Ruch JV, Lesot H, Karcher-Djuricic V, Meyer JM, Mark M.** Epithelial-mesenchymal interactions in tooth germs: mechanisms of differentiation. *J Biol Buccale*, 1983; 11:173-93.
- **Ruch JV, Lesot H, Karcher-Djuricic V, Meyer JM, Olive M.** Facts and hypotheses concerning the control of odontoblast differentiation. *Differentiation.* 1982; 21:7-12.
- **Ruch JV.** Tooth crown morphogenesis and cytodifferentiations: candid questions and critical comments. *Connect Tissue Res.* 1995; 32:1-8.
- **Ruch JV.** Odontoblast differentiation and the formation of the odontoblast layer. *J Dent Res.* 1985; 64:489-98.
- **Ruch, JV, Lesot H, Begue-Kirn, C.** Odontoblast differentiation. *Int. J. Dev. Biol.* 1995; 39:51-68.
- **Sakakura Y, Fujiwara N, Sugawara M, Nawa T.** In vitro effects of calcitonin and/or parathyroid hormone on odontogenesis of mouse embryonic molars. *J Dent Res.* 1989; 68:1279-84.
- **Scott J.H, Symons N.B.** Introduction to dental anatomy, 9th ed. 1982 New York: Churchill Livingstone.

- **Shapiro A, Lakey J, Ryan E.** Islet transplantation in seven patients with type 1 diabetes mellitus using a glucocorticoid-free immunosuppressive regimen. *N Engl J Med.* 2000; 343:230-8.
- **Sharpe PT.** Neural crest and tooth morphogenesis. *Adv Dent Res.* 2001; 15:4-7.
- **Shing Y, Folkman J, Sullivan R, Butterfield C, Murray J, Klagsbrun M.** Heparin affinity: purification of a tumor-derived capillary endothelial cell growth factor. *Science.* 1984; 22:1296-9.
- **Sigal MJ, Aubin JE, Ten Cate AR, Pitaru S.** The odontoblast process extends to the dentinoenamel junction: an immunocytochemical study of rat dentin. *J Histochem Cytochem.* 1984; 32:872-7.
- **Slavkin H.C.** Molecular determinants during dental morphogenesis and cytodifferentiation. *J Craniofac Genet Dev Biol.* 1991; 11:338-49.
- **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; 12:425-37.
- **Smith CE, Nanci A.** Overview of morphological changes in enamel organ cells associated with major events in amelogenesis. *Int J Dev Biol.* 1995; 39:153-161.
- **Smith, AJ.** Tooth tissue engineering and regeneration--a translational vision! *J. Dent. Res.* 83; 517, 2004.
- **Svendsen CN, Caldwell MA, Ostenfeld T.** Human neural stem cells: isolation, expansion and transplantation. *Brain Pathol.* 1999; 9:499-513.
- **Takahashi K.** Vascular architecture of dog pulp using corrosion resin cast examined under a scanning electron microscope. *J Dent Res.* 1985; 64:579-84.
- **Takuma S, Nagai N.** Ultrastructure of rat odontoblasts in various stages of their development and maturation. *Arch Oral Biol.* 1971; 16: 993-101
- **Ten Cate AR.** *Oral histology: development, structure and function*, 5th ed. St. Louis, MO: 1998 Mosby.

- **Thesleff I, Barrach H.J, Foidart J.M, Vaheiri A, Pratt R.M, Martin G.R.** Changes in the distribution of type IV collagen, laminin, proteoglycan and fibronectin during mouse tooth development. *Dev. Biol.* 1981 ; 81: 182-192.
- **Thesleff I, Sharpe P.** Signalling networks regulating dental development. *Mech Dev.* 1997 ; 67:111-23.
- **Thesleff I, Vaahtokari A, Partanen A.M.** Regulation of organogenesis. Common molecular mechanisms regulating the development of teeth and other organs. *Int J Dev Biol*, 1995, 39:35-50.
- **Thesleff I.** Epithelial-mesenchymal signalling regulating tooth morphogenesis. *J Cell Sci*, 2003; 116:1647-8.
- **Thisse C, Zon L.I.** Organogenesis--heart and blood formation from the zebrafish point of view. *Science.* 2002; 18:457-62.
- **Tsuzuki S, Sasa S.** Ultrastructural observation of capillary sprouts in the dental organs of rat molars. *Acta Anat Nippon.* 1994; 69:684–696.
- **Tucker A, Sharpe PT.** The cutting-edge of mammalian development; how the embryo makes teeth. *Nat Rev Genet*, 2004, 7:499-508
- **Vaahtokari A, Aberg T, Thesleff I.** Apoptosis in the developing tooth: association with an embryonic signaling center and suppression by EGF and FGF-4. *Development.* 1996; 122:121-9.
- **Vainio S, Karavanova I, Jowett A, Thesleff I.** Identification of BMP-4 as a signal mediating secondary induction between epithelial and mesenchymal tissues during early tooth development. *Cell.* 1993; 75:45-58.
- **Vyklický L, Knotková-Urbancová H.** Can sensory neurones in culture serve as a model of nociception? *Physiol Res.* 1996; 45:1-9.
- **Woltgens JH, Lyaruu D.M, Bronckers AL, Bervoets TJ, Van Duin M.** Biom mineralization during early stages of the developing tooth in vitro with special reference to secretory stage of amelogenesis. *Int J Dev Biol.* 1995; 39:203-12.

- **Yoshida N, Yoshida K, Aberdam D, Meneguzzi G, Perrin-Schmitt F, Stoetzel C, Ruch JV, Lesot H.** Expression and localization of laminin-5 subunits during mouse tooth development. *Dev Dyn.* 1998; 211: 164-76.
- **Yoshida S, Ohshima H.** Distribution and organization of peripheral capillaries in dental pulp and their relationship to odontoblasts. *Anat Rec.* 1996; 245:313-26.
- **Young C.S, Abukawa H, Asrican R, Ravens M, Troulis M.J, Kaban L.B, Vacanti JP, Yelick PC.** Tissue-engineered hybrid tooth and bone. *Tissue Eng.* 2005; 11:1599-610.
- **Young CS, Terada S, Vacanti JP, Honda M, Bartlett JD, Yelick PC.** Tissue engineering of complex tooth structures on biodegradable polymer scaffolds. *J Dent Res.* 2002; 81:695-700.
- **Zhou Y, Gunput RA, Pasterkamp RJ.** Semaphorin signaling: progress made and promises ahead. *Trends Biochem Sci.* 2008; 33:161-70.



## ABSTRACT

Tooth engineering is a major challenge in the regenerative medicine. The strategy we have developed in our laboratory using the mouse as a model, allowed the development of the crown *in vitro* when culturing reassociations between epithelial and mesenchymal embryonic dental cells. The implantation of cultured dental cell-cell re-associations under skin in adult mice allows for the reproduction of fully formed teeth: crown morphogenesis, epithelial histogenesis, mineralized dentin and enamel deposition, and root-periodontium development. In this work complementary aspects were investigated.

**a) Vascularization:** Vascularization is critical for organogenesis and tissue engineering. In this work we have studied: (1) blood vessel formation during tooth development, (2) the fate of blood vessels in cultured teeth and reassociations, and (3) vascularization after *in vivo* implantation. *Ex vivo*, blood vessels developed in the dental mesenchyme from the cap to bell stages and in the enamel organ, shortly before ameloblast differentiation. In cultured teeth and reassociations, blood vessels were absent from the dental tissues. After implantation, both teeth and re-associations became revascularized, although later in the case of the re-associations. In implanted reassociations, newly formed blood vessels originated from the host, allowing for their survival, and affording conditions for organ growth, mineralization, and enamel secretion.

**b) Innervation:** Our results (from ED14 to 2 days after birth) show that the innervation of mice molars dental pulps begins after the beginning of the enamel deposition. The nerve fibers detected by immunolocalization of peripherin are mainly found along blood vessels in the lower part of the pulp. However, these nerve fibers were never detected either in cultured intact molars or in reassociations. We also observed that the semaphorins 3a and 7a have opposite patterns. NGF is found at the basal zone of ameloblasts from the late bell stage, whereas p75 is detected after birth. The absence of the innervation of reassociations, as well as cultured molars, can be explained by the absence of trigeminal nerve physiologically responsible for this process. To overcome this problem, we performed co-cultures of teeth and reassociations with DRG (Dorsal Root Ganglia) isolated from mouse embryos of ED10. After 4 days of coculture, DRG axons grow toward the explants, but without reaching the dental pulp. These observations apply to both cultured intact molars and reassociations. To check whether the *in vitro* conditions by themselves were not limiting, reassociations or intact molars were implanted in contact with DRG in adult mice. Our results, one week after implantation, showed that the axons grow in the periimplants tissues, without reaching the tooth. These observations lead us to believe that some molecular factors preclude the growth of nerve fibers in dental tissues.

**c) Crown morphology:** Since i) the mesenchyme controls crown morphogenesis and ii) the primary enamel knot (PEK) is involved in signaling this morphogenesis, the formation and fate of this structure was investigated (1) in heterotopic reassociations between embryonic day 14 (ED14) incisor and molar enamel organs and mesenchymes, and (2) in reassociations between ED14 molar enamel organs and bone marrow-derived cells (BMDC). A PEK formed in cultured heterotopic dental tissue reassociations. The mesenchyme controls the fate of the PEK cells, incisor or molar-specific using apoptosis as criterion, and functionality to drive single/multiple cusps tooth development. This may explain how, specifying the PEK, the mesenchyme may control crown morphogenesis.

**d) The use for easily available nondental competent cell sources:** previous investigations showed that BMDC can differentiate as odontoblast- or ameloblast-like cells. When reassociated to an enamel organ BMDC could not support the development of multicusp teeth. These cells apparently could neither maintain nor stimulate the formation of a PEK, which could result from the inability of bone marrow cells to store signaling molecules.

**Key words:** Tooth, tissue engineering, vascularization, innervation, bone marrow cells.



## RESUME

La reconstitution d'une dent entière est un défi majeur de la médecine régénérative. Le modèle d'ingénierie dentaire élaboré dans notre unité de recherche, permet d'obtenir à partir de réassociations entre cellules épithéliales et cellules mésenchymateuses (CE/CM) le développement de la couronne dentaire *in vitro*. Après implantation en sous-cutané chez la souris adulte de ces réassociations cultivées, il est possible d'obtenir le début de la rhizogénèse, du système d'ancrage, et aussi une meilleure apposition de la dentine et de l'émail. Dans ce travail de thèse nous avons analysé quatre points complémentaires :

**a) Vascularisation :** Nos résultats montrent que les vaisseaux sanguins se mettent en place progressivement dans les différents compartiments de la dent. Le mésenchyme commence à se vasculariser dès le jour embryonnaire<sup>14</sup> (ED14). Au stade de la cloche (ED18), les vaisseaux sanguins pénètrent dans l'organe de l'émail. C'est à ce stade que commence la différenciation fonctionnelle des odontoblastes et, 24 heures plus tard, celle des améloblastes. *In vitro* les réassociations CE/CM, ne peuvent pas être vascularisées. L'implantation de ces cultures permet le début de la formation des vaisseaux sanguins, tout d'abord autour des implants, puis dans la pulpe dentaire, et enfin, dans l'organe de l'émail. La seule différence dans le processus de vascularisation entre les molaires et les réassociations implantées tient à sa cinétique. La revascularisation progresse plus rapidement dans les molaires intactes que dans les réassociations. L'implantation dans la mâchoire nous permet d'obtenir des dents entièrement formées et vascularisées. Des implantations chez des souris GFP montrent que les vaisseaux détectés dans nos différents implants proviennent de l'hôte.

**b) Innervation :** Nos résultats (de ED14 à 2 jours après la naissance) montrent que l'innervation des pulpes dentaires des molaires de souris commence après le début du dépôt de l'émail. Les fibres nerveuses détectées par immunolocalisation de la périphérine sont principalement présentes le long des vaisseaux sanguins dans la partie inférieure de la pulpe. Par contre ces fibres nerveuses n'ont jamais été détectées ni dans les cultures des molaires intactes ni dans les cultures de réassociations. On a également observé que les sémaphorines 3a et 7a qui interviennent dans la régulation de l'innervation ont des patrons opposés. Le marquage pour la sémaphorine 3a diminue au cours du développement de la dent, alors que celle de la sémaphorine 7a augmente. NGF est détecté au niveau de la zone basale des améloblastes à partir du stade de cloche tardive, tandis que p75 n'est détecté qu'après la naissance. Cette absence d'innervation des réassociations, aussi bien que des molaires en culture, peut s'expliquer par l'absence du nerf trijumeau physiologiquement responsable de l'innervation de la dent. Pour palier ce problème, nous avons réalisé des co-cultures de dents et de réassociations avec des DRG (Dorsal Root Ganglia) prélevés chez des embryons de souris de 10 jours. Après 4 jours de co-culture, les axones des DRG poussent vers nos explants, mais sans atteindre la pulpe dentaire. Ces observations concernent aussi bien les molaires intactes que les réassociations cultivées. Pour vérifier que les conditions *in vitro* par elles-mêmes n'étaient pas limitantes, des réassociations ou des molaires intactes cultivées ont été implantées chez des souris adultes au contact de DRG prélevés. Nos résultats après une semaine d'implantation montrent que les axones poussent dans les tissus périimplantaires, sans atteindre les tissus dentaires. Ces résultats nous amènent à penser que certains facteurs moléculaires s'opposent à la croissance des fibres nerveuses dans les tissus dentaires.

**c) Rôle du mésenchyme dans la spécification du NEP :** Le mésenchyme contrôle la morphogénèse dentaire. Ceci doit faire intervenir un centre de signalisation épithélial : le nœud de l'émail primaire (NEP). Les caractéristiques cellulaires du NEP sont différentes selon le type dentaire. Au stade de capuchon, l'apoptose intervient dans l'élimination des cellules internes du NEP des germes de molaire, ce qui n'est pas le cas pour les germes d'incisive. Par des expériences de dissociations/réassociations hétérotopiques entre épithélium et mésenchyme d'incisive et molaire au stade capuchon, nous avons montré que le mésenchyme de molaire induit l'apparition d'apoptoses dans le NEP de l'incisive et inversement, le mésenchyme incisive inhibe l'apoptose dans le NEP de la molaire. En conclusion, le mésenchyme spécifie les caractéristiques du NEP qui se forme dans ces réassociations. Cela peut permettre d'expliquer le rôle du mésenchyme dans la morphogénèse dentaire.

**d) Utilisation des cellules de la moelle osseuse dans l'ingénierie dentaire :** La moelle osseuse contenant des cellules multipotentes semble représenter une alternative intéressante au mésenchyme dentaire. Ohazama et coll., (2004) avaient montré que les cellules de la moelle osseuse réassociées avec un épithélium compétent, permettaient de remplacer les cellules du mésenchyme dentaire pour former une dent. Toutefois la morphologie de la couronne n'était pas satisfaisante (absence de cuspides). Le développement des cuspides étant contrôlé par le NEP, nous avons cherché à savoir si les cellules de la moelle pouvaient induire la formation de ce centre de signalisation. Pour cela, nous avons remplacé le mésenchyme des germes de molaire au stade de capuchon par les cellules de la moelle osseuse prélevées et cultivées comme décrit par Ohazama et coll., (2004). Ces cellules ont été réassociées avec un épithélium dentaire du jour 14 dont nous savons qu'il est compétent. Les dents qui se développent à partir de ces réassociations, montrent une histogénèse épithéliale comprenant l'ensemble des compartiments sauf le NEP. Cela explique l'absence de formation de cuspides; ce qui pourrait résulter de l'incapacité des cellules de la moelle osseuse à stocker les molécules de signalisation d'origine épithéliales.

**Mots clés:** Dent, ingénierie tissulaire, vascularisation, innervation, cellules de la moelle osseuse.