

**UNIVERSITE TOULOUSE III - PAUL SABATIER**  
**FACULTE DE SANTE - DEPARTEMENT D'ODONTOLOGIE**

---

ANNEE 2022

2022 TOU3 3052

**THESE**

POUR LE DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN CHIRURGIE DENTAIRE

Présentée et soutenue publiquement

par

**Clothilde BROCA**

Le 10 octobre 2022

**CELLULES STROMALES DU TISSU ADIPEUX EN INGENIERIE TISSULAIRE DES  
PARODONTITES : DEVELOPPEMENT DE MODELES D'ETUDE EX VIVO  
INNOVANTS DEDIES AU SUIVI DES INTERACTIONS CELLULAIRES**

Directeur de thèse : Dr Paul MONSARRAT

**JURY**

Président :	Pr Philippe KEMOUN
1 <sup>er</sup> assesseur :	Dr Valérie PLANAT-BENARD
2 <sup>ème</sup> assesseur :	Dr Paul MONSARRAT
3 <sup>ème</sup> assesseur :	Dr Charlotte THOMAS
Membre invité :	Pr Geneviève GREGOIRE



**Faculté de santé**  
**Département d'Odontologie**

➔ **DIRECTION**

**Doyen de la Faculté de Santé**

M. Philippe POMAR

**Vice Doyenne de la Faculté de Santé**  
**Directrice du Département d'Odontologie**

Mme Sara DALICIEUX-LAURENCIN

**Directeurs Adjointes**

Mme Sarah COUSTY  
M. Florent DESTRUHAUT

**Directrice Administrative**

Mme Muriel VERDAGUER

**Présidente du Comité Scientifique**

Mme Cathy NABET

➔ **HONORARIAT**

**Doyens honoraires**

M. Jean LAGARRIGUE +  
M. Jean-Philippe LODTER +  
M. Gérard PALOUDIER  
M. Michel SIXOU  
M. Henri SOULET

**Chargés de mission**

M. Karim NASR (*Innovation Pédagogique*)  
M. Olivier HAMEL (*Maillage Territorial*)  
M. Franck DIEMER (*Formation Continue*)  
M. Philippe KEMOUN (*Stratégie Immobilière*)  
M. Paul MONSARRAT (*Intelligence Artificielle*)

➔ **PERSONNEL ENSEIGNANT**

**Section CNU 56 : Développement, Croissance et Prévention**

**56.01 ODONTOLOGIE PEDIATRIQUE et ORTHOPEDIE DENTO-FACIALE** (Mme Isabelle BAILLEUL-FORESTIER)

**ODONTOLOGIE PEDIATRIQUE**

Professeurs d'Université : Mme Isabelle BAILLEUL-FORESTIER, M. Frédéric VAYSSE  
Maîtres de Conférences : Mme Emmanuelle NOIRRIT-ESCLASSAN, Mme Marie- Cécile VALERA, M. Mathieu MARTY  
Assistants : Mme Marion GUY-VERGER,  
Adjoints d'Enseignement : M. Sébastien DOMINE, M. Robin BENETAH, M. Mathieu TESTE,

**ORTHOPEDIE DENTO-FACIALE**

Maîtres de Conférences : M. Pascal BARON, Mme Christiane LODTER, M. Maxime ROTENBERG  
Assistants : M. Vincent VIDAL-ROSSET, Mme Carole VARGAS  
Adjoints d'Enseignement : Mme. Isabelle ARAGON

**56.02 PRÉVENTION, ÉPIDÉMIOLOGIE, ÉCONOMIE DE LA SANTÉ, ODONTOLOGIE LÉGALE** (Mme NABET Catherine)

Professeurs d'Université : M. Michel SIXOU, Mme Catherine NABET, M. Olivier HAMEL, M. Jean-Noël VERGNES  
Assistante : Mme Géromine FOURNIER  
Adjoints d'Enseignement : M. Alain DURAND, Mlle. Sacha BARON, M. Romain LAGARD, M. Jean-Philippe GATIGNOL  
Mme Carole KANJ, Mme Mylène VINCENT-BERTHOUMIEUX, M. Christophe BEDOS

**Section CNU 57 : Chirurgie Orale, Parodontologie, Biologie Orale**

**57.01 CHIRURGIE ORALE, PARODONTOLOGIE, BIOLOGIE ORALE** (M. Philippe KEMOUN)

**PARODONTOLOGIE**

Maîtres de Conférences Mme Sara DALICIEUX-LAURENCIN, Mme Alexia VINEL, Mme. Charlotte THOMAS  
Assistants: M. Joffrey DURAN  
Adjoints d'Enseignement : M. Loïc CALVO, M. Christophe LAFFORGUE, M. Antoine SANCIER, M. Ronan BARRE ,  
Mme Myriam KADDECH, M. Matthieu RIMBERT,

### CHIRURGIE ORALE

Professeur d'Université : Mme Sarah COUSTY  
Maîtres de Conférences : M. Philippe CAMPAN, M. Bruno COURTOIS  
Assistants : M. Clément CAMBRONNE  
Adjoints d'Enseignement : M. Gabriel FAUXPOINT, M. Arnaud L'HOMME, Mme Marie-Pierre LABADIE, M. Luc RAYNALDY, M. Jérôme SALEFRANQUE,

### BIOLOGIE ORALE

Professeur d'Université : M. Philippe KEMOUN  
Maîtres de Conférences : M. Pierre-Pascal POULET, M. Vincent BLASCO-BAQUE, M. Matthieu MINTY  
Assistants : Mme Chiara CECCHIN-ALBERTONI, M. Maxime LUIS, Mme Valentine BAYLET GALY-CASSIT  
Adjoints d'Enseignement : M. Mathieu FRANC, M. Hugo BARRAGUE, M. Olivier DENY

## Section CNU 58 : Réhabilitation Orale

### 58.01 DENTISTERIE RESTAURATRICE, ENDODONTIE, PROTHESES, FONCTIONS-DYSFONCTIONS, IMAGERIE, BIOMATERIAUX (M. Franck DIEMER)

#### DENTISTERIE RESTAURATRICE, ENDODONTIE

Professeur d'Université : M. Franck DIEMER  
Maîtres de Conférences : M. Philippe GUIGNES, Mme Marie GURGEL-GEORGELIN, Mme Delphine MARET-COMTESSE  
Assistants : M. Sylvain GAILLAC, Mme Sophie BARRERE, Mme. Manon SAUCOURT, M. Ludovic PELLETIER  
M. Nicolas ALAUX, M. Vincent SUAREZ  
Adjoints d'Enseignement : M. Eric BALGUERIE, M. Jean- Philippe MALLET, M. Rami HAMDAN, M. Romain DUCASSE, Mme Lucie RAPP

#### PROTHÈSES

Professeurs d'Université : M. Philippe POMAR  
Maîtres de Conférences : M. Rémi ESCLASSAN, M. Florent DESTRUHAUT, M. Antoine GALIBOURG,  
Assistants : Mme Margaux BROUTIN, Mme Coralie BATAILLE, Mme Mathilde HOURSET, Mme Constance CUNY  
M. Julien GRIFFE  
Adjoints d'Enseignement : M. Christophe GHRENASSIA, Mme Marie-Hélène LACOSTE-FERRE, M. Olivier LE GAC, M. Jean-Claude COMBADAZOU, M. Bertrand ARCAUTE, M. Fabien LEMAGNER, M. Eric SOLYOM, M. Michel KNAFO, M. Alexandre HEGO DEVEZA, M. Victor EMONET-DENAND M. Thierry DENIS, M. Thibault YAGUE

#### FONCTIONS-DYS FONCTIONS , IMAGERIE, BIOMATERIAUX

Maîtres de Conférences : Mme Sabine JONIOT, M. Karim NASR, M. Paul MONSARRAT, M. Thibault CANCEILL  
Assistants : M. Julien DELRIEU, M. Paul PAGES, Mme. Julie FRANKEL  
Adjoints d'Enseignement : Mme Sylvie MAGNE, M. Thierry VERGÉ, M. Damien OSTROWSKI

-----  
*Mise à jour pour le 01 Septembre 2022*

## REMERCIEMENTS

A mes parents, pour leur amour et leur soutien inconditionnel. Je vous remercie infiniment pour les valeurs que vous m'avez transmises, et pour avoir toujours cru en moi.

A mes grands-parents, pour leur amour et leur dévouement. Je vous en suis éternellement reconnaissante.

A mes cousins, Valentin, Paul, Lisa, Jade et Morane, pour les liens forts qui nous unissent.

A toute ma famille, pour leur soutien et leur bienveillance qui m'apportent joie et bonheur au quotidien.

A Fabienne, tu me connais depuis toute petite et tu fais ainsi partie de ma « famille de cœur ». Merci de m'avoir permis de travailler au sein de ton cabinet. Tes conseils et ton soutien ont été d'une aide précieuse.

A Laura, pour tous les bons moments de notre enfance passés ensemble et nos éclats de rire.

A Christine, ma « marraine de cœur », pour ton soutien sans faille et tes marques d'amour.

A Stephanie et Caroline, pour toute votre bienveillance, votre gentillesse, et vos valeurs.

Au Pr Philippe Pomar, pour votre disponibilité, votre soutien et vos qualités humaines. Ce fut un immense plaisir de vous côtoyer au sein de la Faculté. Soyez assuré de mon plus profond respect et de ma gratitude.

A Michel Attiogbé, pour toute votre implication et votre engagement dévoué auprès des étudiants.

A Marie-Clémence, pour tes conseils avisés, ta sympathie, et ton amitié.

A Selma, Laetitia Pieruccioni, Corinne Lorenzo et Jacques Rouquette, sans qui ce travail n'aurait pas été possible. Merci pour votre implication et votre sympathie. Je tiens également à remercier l'ensemble des équipes des laboratoires de l'ITAV et de STROMALab ayant participé à ce travail.

Aux Dr Benoît Thibault et Augustin Le Naour, pour toute votre bienveillance et gentillesse depuis notre rencontre lors de mon Master de Bioingénierie. Par la suite, une belle amitié est née... Merci d'avoir posé les jalons de ma formation scientifique. Vos conseils avisés me sont, encore aujourd'hui, d'une aide précieuse.

Au Pr Bettina Couderc, pour son accompagnement lors de mon Master et sa sympathie. Je garderai en mémoire tous nos bons moments passés ensemble et nos riches échanges teintés d'humour.

A Anne-Gaëlle, Emilie, Michel et Jean, s'il existait des piliers de l'amitié vous en feriez incontestablement partie. Les liens que nous avons pu établir au fil du temps nous lient comme les doigts de la main. Quel bonheur de vous avoir à mes côtés !

A Sophie et Cyrielle, pour les si bons moments passés ensemble. Le temps file, l'amitié demeure, et les éclats de rires sont légion. Vous êtes de vrais rayons de soleil.

A Maëlle, Melanie (ma binôme), Lise, Lucie, Anouk, Béatrice, Salomé, Estelle, merci pour ces bons moments partagés ensemble. Je garde d'excellents souvenirs de notre formation et je suis ravie d'avoir construit de forts liens d'amitié avec vous. Ils serviront de base solide pour la suite de notre vie personnelle et professionnelle.

A Sandra, Agathe, Manon, Julie. C, Valérie, Elie, Jennifer, Mayé, Yasin, pour nos belles amitiés.

A Rachel et Baptiste, pour votre soutien et votre gentillesse. Quel plaisir d'avoir fait votre connaissance !

A mes collègues de promotion, pour leur entraide dans nos galères respectives lors des travaux pratiques.

Aux membres de la Société Médico-Dentaire d'Occitanie, merci pour votre soutien.

A l'ensemble du personnel de la Faculté, qui œuvre pour assurer notre formation.

A tous ceux que je n'ai pas cités mais que je n'ai pas oubliés.

A ma grand-mère, Mina, je te dédie cette thèse.

**A notre président du jury,**

**Monsieur le Professeur Philippe KEMOUN**

- Professeur des Universités, Praticien Hospitalier d'Odontologie,
- Docteur en Chirurgie Dentaire,
- Docteur de l'Université Paul Sabatier,
- Habilitation à Diriger les recherches (HDR),
- Lauréat de l'Université Paul Sabatier,
- Responsable de la Section CNU 57 : Chirurgie Orale, Parodontologie, Biologie Orale.

*Vous m'avez fait l'honneur de présider ce jury de thèse, je vous en remercie sincèrement. Votre passion pour la Recherche, votre rigueur scientifique et la qualité de vos enseignements m'ont profondément inspirée. En parallèle de mes études, j'ai beaucoup apprécié de travailler au sein de votre équipe sur des projets de recherche captivants et stimulants. Ces expériences m'ont permis d'entretenir mes connaissances liées à mon premier cursus, ce qui me tenait particulièrement à cœur. Vous avez été mon premier contact au sein de la Faculté, disponible et à l'écoute, je ne l'oublierai pas et je vous en suis très reconnaissante. Je vous remercie pour vos conseils ainsi que pour la confiance que vous m'avez accordée tout au long de mon parcours universitaire. Veuillez recevoir l'expression de mon plus profond respect et de ma gratitude.*

**A notre jury de thèse,**

**Madame le Docteur Valérie PLANAT-BENARD**

- Maître de Conférences des Universités, Université Paul Sabatier Toulouse 3,
- Habilitation à Diriger les Recherches (HDR)
- Co-directrice de l'équipe 4 de l'Institut RESTORE.

*Je vous remercie de me faire l'honneur de siéger à ce jury de thèse. Je garde en mémoire votre sympathie ainsi que la clarté et la précision de vos enseignements, parmi les cours les plus passionnants auxquels j'ai pu assister lors de mon Master de Bioingénierie. Votre présence au sein de ce jury me réjouit et revêt une signification toute particulière à mes yeux puisqu'elle constitue un « joli clin d'œil » à mon cursus précédent. Veuillez trouver ici l'expression de ma reconnaissance et de ma profonde considération.*

**A notre directeur de thèse,**

**Monsieur le Docteur Paul MONSARRAT**

- Maître de Conférences des Universités, Praticien Hospitalier d'Odontologie,
- Lauréat de la Faculté de Médecine Ranguel et de Chirurgie Dentaire de l'Université Paul Sabatier,
- Docteur de l'Université Paul Sabatier - Spécialité Physiopathologie,
- Diplôme Universitaire d'Imagerie 3D maxillo-faciale,
- Diplôme Universitaire de Recherche Clinique en Odontologie,
- Habilitation à Diriger les Recherches (HDR).

*Je vous remercie d'avoir accepté la direction de cette thèse. Votre vif intérêt pour la Recherche, votre curiosité scientifique et la qualité de vos enseignements ont été une réelle source de motivation lors de ma formation au sein de la Faculté. Sur le plan humain, votre bienveillance, votre écoute et vos conseils m'ont particulièrement marquée. Je garderai en mémoire tous les bons moments partagés au sein de l'équipe concernant les projets de recherche. Je tiens à vous remercier vivement pour votre aide précieuse apportée en Clinique, votre bonne humeur communicative, et la confiance dont vous m'avez témoignée tout au long de mon cursus universitaire. Soyez assuré de ma reconnaissance et de ma profonde estime.*

**A notre jury de thèse,**

**Madame le docteur Charlotte THOMAS**

- Maître de Conférences des Universités, Praticien Hospitalier d'Odontologie,
- Docteur en Chirurgie Dentaire,
- Docteur de l'Université Paul Sabatier,
- Ancienne interne des Hôpitaux de Toulouse,
- Diplôme d'Etudes Spécialisées de Médecine Bucco-Dentaire (DES MBD),
- Diplôme Universitaire de Parodontologie,
- Diplôme Universitaire de Conception Fabrication Assistée par Ordinateur (CFAO) en Odontologie,
- Lauréate de l'Université Paul Sabatier.

*C'est un grand plaisir de vous compter parmi les membres du jury de cette thèse. Votre sympathie, votre pédagogie et votre soutien m'ont beaucoup apportée lors de ma formation. Je vous remercie pour votre implication et votre engagement dévoué, au sein de la Clinique, dans la prise en charge et le suivi des patients en Parodontologie. Sur un plan plus personnel, je suis ravie d'avoir fait votre connaissance il y a quelques années de cela et d'avoir ainsi pu continuer à entretenir ce lien tout au long de mes études. Veuillez trouver ici le témoignage de mon amitié sincère.*

**A notre jury de thèse,**

**Madame le Professeur Geneviève GREGOIRE**

- Docteur en Chirurgie Dentaire,
- Docteur en Sciences Odontologiques,
- Docteur d'Etat en Odontologie,
- Habilitation à Diriger les Recherches (HDR),
- Lauréate de l'Université de Paris,
- Lauréate de l'Université Paul Sabatier, Toulouse III.

*Je suis particulièrement honorée et touchée par votre présence à ce jury de thèse. Nous avons fait connaissance lors de ma 2<sup>ème</sup> année de formation à la Faculté, où vous m'avez proposé d'intégrer la Société Médico-Dentaire d'Occitanie à l'issue d'un colloque. Depuis ce jour, nous avons commencé à nous côtoyer et avons, peu à peu, construit et renforcé ce lien au fur et à mesure des années. J'ai pu mesurer toute la rigueur et la méticulosité qui caractérise votre travail et les tâches que vous accomplissez, aussi bien au sujet de l'organisation des événements de la Société que dans vos travaux de recherche. Votre parcours, votre humilité, ainsi que l'étendue de vos connaissances et compétences suscitent le respect et l'admiration. Sur le plan personnel, vos qualités humaines m'ont particulièrement touchée. Votre bienveillance, vos conseils et votre soutien ont été de solides atouts lors de ma formation. J'ai beaucoup apprécié de travailler à vos côtés au sein de la Société Médico-Dentaire d'Occitanie et je souhaite, à l'avenir, que nous puissions continuer à réaliser de beaux projets. Je vous adresse tous mes remerciements pour les bons moments partagés ensemble ainsi que pour la complicité qui nous unit. Soyez assurée de ma profonde gratitude et de mon amitié sincère.*

# Table des matières

I. Introduction.....	16
1. Contexte clinique : le parodonte.....	16
A. Structure et fonctions de ses différents constituants.....	16
a. Muqueuse gingivale.....	16
b. Cément.....	17
c. Ligament parodontal.....	18
d. Os alvéolaire.....	19
B. Définition des concepts de réparation et de régénération parodontale.....	19
2. La maladie parodontale.....	20
A. Epidémiologie.....	20
B. Physiopathologie.....	21
C. Immuno-histopathologie.....	22
3. Traitements de la parodontite.....	23
A. Thérapeutiques conventionnelles.....	23
B. Thérapeutiques régénératives.....	25
a. Greffes osseuses/substituts osseux.....	25
b. Régénération tissulaire guidée.....	26
c. Régénération tissulaire induite.....	26
d. Techniques combinées.....	27
C. Résultats des techniques de régénération actuelles.....	27
4. Thérapie cellulaire du parodonte.....	28
A. Une approche prometteuse.....	28
B. Différents types de cellules souches mésenchymateuses.....	31
C. Les ASC (Adipose-derived stem cells) : source de choix pour une régénération parodontale « ad integrum ».....	32
5. Modèles d'étude des interactions cellulaires en ingénierie tissulaire du parodonte.....	33
A. De la thérapie cellulaire vers l'ingénierie tissulaire.....	33
B. Modèles précliniques <i>in vivo</i> chez l'animal.....	34
C. Besoin de modèles d'étude 3D innovants <i>in vitro/ex vivo</i> .....	39
D. Méthodes d'exploration pour l'évaluation préclinique des modèles d'étude 3D.....	40
6. Le projet ANR ASC-PARO.....	41
A. Objectif de l'étude.....	41

B. Présentation des modèles 3D expérimentaux et déroulement de l'étude.....	41
II. Matériel et méthodes.....	42
1. Culture cellulaire .....	42
A. Types cellulaires .....	42
B. Digestion de tissus humains .....	42
C. Culture cellulaire .....	42
D. Marquage cellulaire .....	42
2. Modèles expérimentaux.....	43
A. Culture d'ASC en hydrogel .....	43
B. Constitution de sphéroïdes de SVF parodontale.....	43
C. Constitution de sphéroïdes de MSG gingivales.....	44
D. Sphéroïdes parodontaux au sein du biohybride d'ASC.....	44
E. Culture d'explant de gencive sur tranche de dentine .....	44
F. Greffe de biohybride d'ASC entre explant de gencive et tranche de dentine .....	44
3. Imagerie.....	45
A. Microscope binoculaire.....	45
B. Acquisition en temps réel de cultures cellulaires en 2D au videomicroscope.....	45
C. Microscopie à feuille de lumière : (Annexe 6).....	45
D. Traitement d'image : (Annexe 7) .....	45
III. Résultats .....	46
1. Optimisation de la détection différentielle des ASC et MSC-G en 2D.....	46
2. Caractérisation de l'hydrogel de lysat plaquettaire contenant des ASC humaines en cinétique par imagerie 3D .....	48
3. Caractérisation de sphéroïdes de Fraction Stromale Vasculaire (SVF) parodontale sur une cinétique de 7 jours.....	51
4. Caractérisation de sphéroïdes de MSC gingivales sur une cinétique de 7 jours.....	53
5. Caractérisation d'une greffe de biohybride d'ASC humaines marquées dans un modèle de culture gingivale sur tranche de dentine en cinétique .....	53
A. Par imagerie au MacroSPIM.....	53
B. Par imagerie confocale.....	55
IV. Discussion.....	57
1. Optimisation des marquages cellulaires en vue de l'exploration des interactions ASC/MSC-G au sein des modèles expérimentaux.....	57
2. Etude des interactions ASC/MSC-G au sein des modèles 3D expérimentaux dans le cadre du processus de régénération parodontale .....	59

A. Modèle <i>ex vivo</i> « gencive-like » (encore appelé modèle <i>in toto</i> ) .....	59
B. Modèle <i>in vitro</i> « gencive-like » .....	62
C. Intérêts et complémentarité des modèles.....	64
3. Perspectives.....	65
<b>Conclusion</b> .....	70
LISTE DES FIGURES.....	71
LISTE DES TABLEAUX .....	73
BIBLIOGRAPHIE.....	74
ANNEXES.....	83
RESUME EN ANGLAIS .....	93

## LISTE DES ABREVIATIONS

ALP : Alkaline phosphatase  
Alpha-MEM ( $\alpha$ MEM) : Alpha-Minimum Essential Medium  
Alpha-SMA ( $\alpha$ -SMA) : Alpha-Smooth Muscle Actin  
ANR : Agence Nationale de la Recherche  
APRIL : A Proliferation Inducing Ligand  
ASC : Adipose-derived Mesenchymal Stromal/Stem Cells  
ASP : Amphotéricine B-Streptomycine-Pénicilline  
AT : Acide Tranexamique  
BABB : Benzyl Alcool-Benzyl Benzoate  
BCP : Biphasic Calcium Phosphate  
BG : Bioactive glass  
BioH : Biohybride  
BLyS : B Lymphocyte Stimulator  
BMP : Bone Morphogenetic Protein  
BMSC : Bone Marrow-derived Mesenchymal Stromal/Stem Cells  
BOP : Bleeding On Probing  
BrdU : 5-Bromo-2'-deoxyuridine  
BSP : Bone Sialoprotein  
CaCl<sub>2</sub> : Chlorure de Calcium  
CAFE : Cément acellulaire à fibres extrinsèques  
CAL : Clinical Attachment Level or Loss  
CAP : Cementum Attachment Protein  
CCD : Charge-Coupled Device  
CCFI : Cément Cellulaire à fibres intrinsèques  
CCL2 : Chemokine (C-C motif) Ligand 2  
CCL20 : Chemokine (C-C motif) Ligand 20  
CEMP-1 : Cementum Protein 1  
CGF : Cementum-derived Growth Factor  
COL-1 : Collagène Type I  
COX-2 : Cyclooxygénase 2  
EDTA : Ethylenediaminetetraacetic Acid  
EGM2 : Endothelial Growth Medium 2  
EMD : Enamel Matrix Derivative  
FDA : Food and Drug Administration  
FGF-2 (bFGF) : Fibroblast Growth Factor 2 (basic Fibroblast Growth Factor)  
GFP/(e)GFP : Green Fluorescent Protein/ (enhanced) Green Fluorescent Protein  
GR : Globules Rouges  
HA : Hydroxyapatite  
hDPSC : human Dental Pulp Stem Cells  
HE : Hématoxyline-Eosine  
hLP : hydrogel de Lysat Plaquettaire  
hNSC : human Neural Stem Cells  
IDO : Indoleamine 2,3-dioxygenase  
IFN- $\gamma$  : Interféron gamma  
IL : Interleukine  
KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> : Phosphate mono potassique  
LM : Low Melting

LPS : Lipopolysaccharide  
MeOH : Méthanol  
MSC : Mesenchymal Stromal/Stem cells  
MSC-G (G-MSC) : Gingiva-derived Mesenchymal Stromal/Stem Cells  
MT : Masson's Trichrome  
NaCl : Chlorure de sodium  
NF- $\kappa$ B : Nuclear Factor-Kappa B  
NH<sub>4</sub>Cl : Chlorure d'ammonium  
NIR : Near-Infrared  
OC : Ostéocalcine  
OFD : Open Flap Debridement  
OPG : Ostéoprotégérine  
OPN : Ostéopontine  
OptiMEM : Opti-Minimum Essential Medium  
PAMPs : Pathogen Associated Molecular Patterns  
PBS : Phosphate-Buffered Saline  
PCNA : Proliferating Cell Nuclear Antigen  
PCR/(RT)-PCR : Polymerase Chain Reaction/ (Reverse Transcription)-Polymerase Chain Reaction  
PD : Probing Depth  
PDGF : Platelet-Derived Growth Factor  
PDLSC/(h)PDLSC : (human) Periodontal Ligament Stromal/Stem Cells  
PFA : Paraformaldéhyde  
PGE2 : Prostaglandine E2  
QD : Quantum Dot  
RANK/RANKL : Receptor Activator of NF- $\kappa$ B/Receptor Activator of NF- $\kappa$ B Ligand  
RNA-seq : RNA-sequencing  
RTG : Régénération Tissulaire Guidée  
RTI : Régénération Tissulaire Induite  
SASP : Senescence-Associated Secretory Phenotype  
SHG Microscopy : Second Harmonic Generation Microscopy  
SP : Streptomycine-Pénicilline  
SPIM : Selective Plane Illumination Microscopy  
SVF : Stromal Vascular Fraction  
TA : Température Ambiante  
TCP : Tricalcium Phosphate  
TLR : Toll-Like Receptor  
TNF- $\alpha$  : Tumor Necrosis Factor Alpha  
TSG-6 : Tumor Necrosis Factor-Stimulated Gene-6  
ULA : Ultra Low Attachment  
VEGF : Vascular Endothelial Growth Factor

# I. Introduction

## 1. Contexte clinique : le parodonte

Le parodonte représente l'ensemble des tissus de soutien de la dent. Il constitue une véritable unité structurelle et fonctionnelle formée de tissus de nature et de fonction très différentes, faisant de ce dernier une des structures les plus complexes à régénérer du corps humain (1). L'architecture tissulaire du parodonte comprend le parodonte superficiel, constitué par la muqueuse gingivale, ainsi que le parodonte profond composé par le cément, le ligament parodontal et l'os alvéolaire (Figure 1).

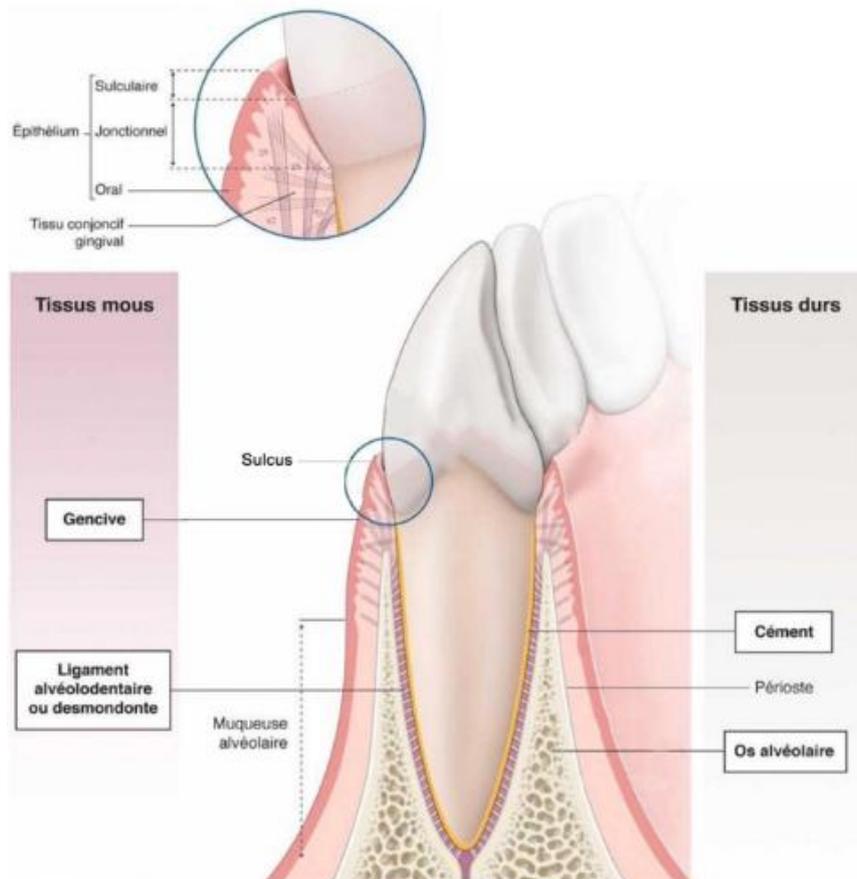


Figure 1 : Tissus formant le parodonte ; source : Bouchard et al. (2).

### A. Structure et fonctions de ses différents constituants

#### a. Muqueuse gingivale

L'épithélium gingival comprend l'épithélium oral en contact direct avec la cavité buccale, l'épithélium sulculaire faisant face à la dent sans y adhérer, et l'épithélium jonctionnel (ou attache épithéliale) permettant l'adhésion de la gencive à la dent (au niveau de l'émail).

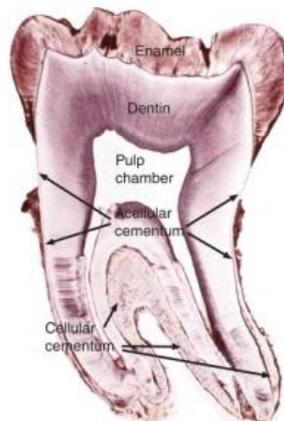
L'épithélium jonctionnel présente une perméabilité importante favorisant la transmigration de fluides et de cellules inflammatoires et immunitaires (3). Il constitue ainsi une structure complexe particulièrement sophistiquée assurant le rôle de première barrière de défense des tissus parodontaux vis-à-vis de l'environnement buccal. Faisant suite à l'attache épithéliale, se trouve le tissu conjonctif gingival (ou attache conjonctive), qui permet l'adhésion de la gencive à la dent (au

niveau du ciment) ainsi qu'à la crête osseuse alvéolaire via différents groupes de fibres gingivales. Ce dernier assure des fonctions de soutien, de protection, de nutrition et d'élimination des déchets. L'ensemble attache épithéliale et attache conjonctive forme l'espace biologique qui mesure environ 2mm. L'intégrité de ce dernier, constituant le support architectural du tissu gingival, est indispensable au maintien de la santé parodontale.

### ***b. Cément***

Le ciment est un tissu dur minéralisé, d'origine conjonctive, qui recouvre l'intégralité de la racine dentaire et possède la particularité d'être avasculaire et non innervé (4). Ses rôles ne sont pas encore clairement définis mais une de ses fonctions principales est de servir d'ancrage en permettant la fixation des fibres desmodontales à la racine de la dent. Il maintient également l'intégrité de la racine en protégeant la dentine sous-jacente et contribue au processus de réparation lorsque la surface radiculaire est endommagée. Selon la littérature, il est désormais établi que le ciment représente une excellente source de facteurs de croissance (5). Il s'agit ainsi d'une structure à fort potentiel biologique dont l'implication dans le cadre de la régénération parodontale tend à être de plus en plus reconnue. En particulier, ses trois protéines cémentaires spécifiques (CGF, CAP, CEMP-1) seraient capables de sélectionner et recruter les cellules stromales mésenchymateuses desmodontales, d'induire leur différenciation, et de réguler le processus de minéralisation associé à la formation de ciment (5,6).

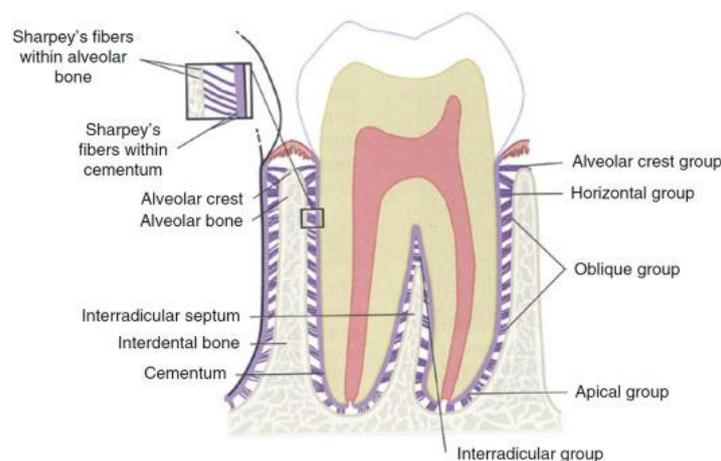
D'un point de vue histologique, il existe différents types de ciments classés suivant leur composante cellulaire ou acellulaire (caractérisée par la présence ou non de cémentocytes) et selon l'origine des fibres de collagène (extrinsèque ou intrinsèque) qui les composent (Figure 2). Dans le cadre de la régénération parodontale, l'objectif visé est la néoformation d'un ciment acellulaire à fibres extrinsèques (CAFE). Ces dernières, étant insérées dans le ciment de manière perpendiculaire à l'axe de la racine, confèrent au CAFE une fonction d'ancrage et un rôle central dans le système d'attache de la dent à l'os alvéolaire. Cependant, dans la plupart des cas, un ciment au rôle principal de réparation est mis en évidence, le ciment cellulaire à fibres intrinsèques (CCFI). Ces fibres sont synthétisées par les cémentoblastes et orientées de manière parallèle à l'axe de la racine, entraînant ainsi une qualité d'attache de la dent aux tissus de soutien moins importante qu'avec le CAFE (7,8).



**Figure 2 :** Coupe histologique de molaire mandibulaire indiquant la localisation des ciments cellulaire et acellulaire ; source : Moss-Salentijn et al. (9).

### ***c. Ligament parodontal***

Le ligament parodontal (aussi nommé ligament alvéolo-dentaire ou desmodonte) est décrit comme étant un tissu conjonctif hautement spécialisé situé entre le ciment et l'os alvéolaire. Il s'agit d'un tissu richement innervé et vascularisé comprenant une diversité cellulaire importante (4). Les fibroblastes constituent le type cellulaire prédominant, ils sont responsables de la production et du renouvellement de la matrice extracellulaire dont les fibres de collagène en sont les composants majeurs. Le desmodonte est ainsi formé par différents types de fibres principales (selon leur localisation/orientation le long de la racine) dont les extrémités sont enchâssées au sein du ciment et de l'os alvéolaire et se retrouvent solidement fixées à ces deux structures à mesure que ces dernières se minéralisent. Ces extrémités sont connues sous le nom de fibres de Sharpey (Figure 3) et demeurent à l'origine du développement du ligament parodontal. Elles sont incontournables au système d'ancrage de la dent aux tissus de soutien et leur restauration constitue un des objectifs de la régénération parodontale (10).



**Figure 3 :** *Fibres principales du desmodonte avec leurs extrémités (fibres de Sharpey) ancrées au sein du ciment et de l'os alvéolaire ; source : Zwetckhenbaum et al. (11).*

Les fibroblastes du ligament parodontal nécessitent une certaine stimulation mécanique pour procéder à l'alignement adéquat des fibrilles de collagène au sein du tissu, mais aussi pour sécréter un ensemble de composés bioactifs impliqués dans la formation et le remodelage de la matrice extracellulaire (12). Le ligament parodontal est ainsi doté d'une importante plasticité et de remarquables capacités d'adaptation fonctionnelles.

Le desmodonte assure une fonction essentielle d'ancrage de la dent au sein de son alvéole et présente également un rôle d'amortissement des forces occlusales. Il possède un rôle sensoriel, notamment de proprioception, via les fibres nerveuses qu'il contient et qui sont capables de transmettre des signaux de pression, ainsi que des sensations douloureuses. Son riche réseau vasculaire lui confère un rôle nutritif important notamment à l'égard de la gencive, du ciment et de l'os, ainsi qu'un rôle dans l'immunité du parodonte par l'intermédiaire des vaisseaux lymphatiques qu'il contient. D'autre part, le ligament parodontal présente une fonction de formation, de remaniement et de réparation du ciment et de l'os alvéolaire, en plus de ses propres structures ligamentaires (13). En effet, il constitue un réservoir cellulaire essentiel pour assurer l'homéostasie tissulaire, la réparation et la régénération des tissus parodontaux notamment via les cellules

souches/stromales mésenchymateuses qu'il renferme (7). Le ligament alvéolo-dentaire représente ainsi le tissu parodontal au potentiel régénératif le plus élevé et se place comme une structure clé dans le processus de régénération parodontale.

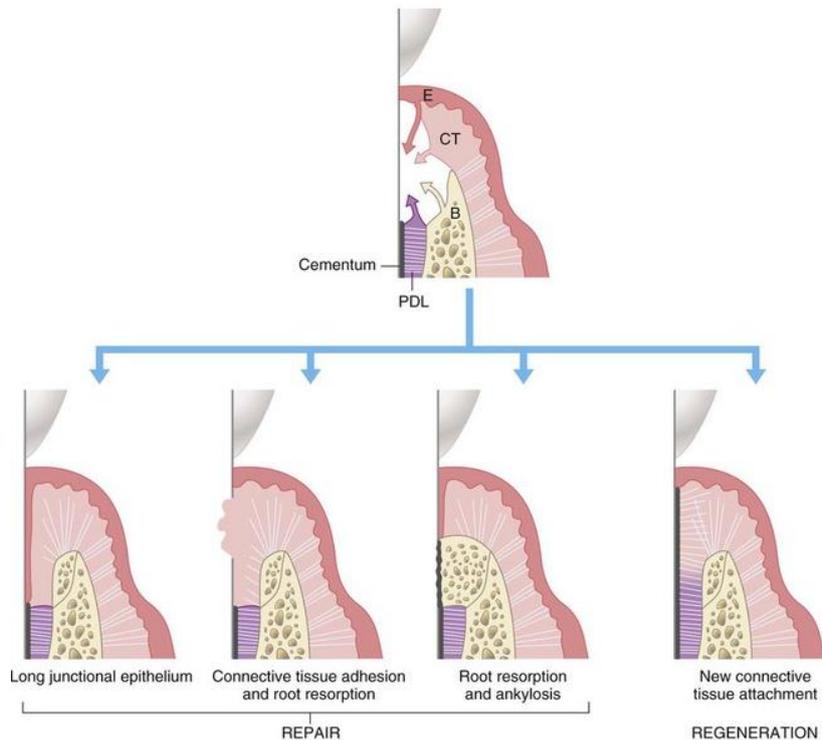
#### ***d. Os alvéolaire***

L'os alvéolaire est un tissu conjonctif minéralisé. Il entoure les racines dentaires et fournit un ancrage aux fibres principales du desmodonte par l'intermédiaire des fibres de Sharpey, insérées au sein de la corticale interne aussi appelée lame criblée ou lamina dura (terme radiologique). Cette dernière favorise les échanges os alvéolaire/ligament parodontal notamment via la présence de nombreux pertuis permettant le passage d'éléments vasculo-nerveux : les canaux de Volkmann (14). Il s'agit d'un tissu osseux unique au sein de l'organisme de par le lien étroit qu'il entretient avec la surface corporelle externe et ainsi avec le biofilm oral, ce dernier jouant un rôle important dans la régulation du remaniement osseux alvéolaire. Ce tissu, doté d'une grande plasticité biologique, assure une fonction d'ancrage et de maintien de la dent au sein de son alvéole ainsi qu'un rôle de calage des dents vis-à-vis des forces masticatrices. Il joue également un rôle nutritif, favorisant notamment les échanges entre le ligament alvéolo-dentaire et le tissu gingival, et participe au maintien de l'équilibre calcique de l'organisme et à l'hématopoïèse, en plus de ses fonctions endocrines (13).

### **B. Définition des concepts de réparation et de régénération parodontale**

Les tissus constituant le parodonte se différencient également suivant leur taux de division cellulaire, les cellules épithéliales ayant le turnover cellulaire le plus important. Ce paramètre est fondamental à prendre en compte dans le cadre de la régénération parodontale et guide l'élaboration de traitements adaptés. Suite à une agression du parodonte, le tissu qui recolonise le premier la surface radiculaire va conditionner la cicatrisation soit vers un processus de réparation, soit vers un processus de régénération (Figure 4).

- Réparation : cicatrisation/guérison d'une lésion par formation d'un tissu qui ne restaure pas intégralement l'architecture ou la fonction de la zone atteinte (G.Kramer 1992).
- Régénération : cicatrisation/guérison d'une lésion qui restaure intégralement l'architecture et la fonction de la zone atteinte (formation de néo-os, néo-ligament, néo-cément), avec notamment la présence de fibres de collagènes fonctionnellement orientées (G.Kramer 1992).



**Figure 4 :** Différents scénarios à l'origine de la cicatrisation parodontale ; source : Rose et al. (15).

La cicatrisation engendrée par les thérapeutiques conventionnelles entraîne, la plupart du temps, la colonisation de la surface radiculaire par les cellules épithéliales, aboutissant à la formation d'un épithélium jonctionnel long empêchant l'attache conjonctive. La surface radiculaire peut également être colonisée, en premier lieu, par les cellules du tissu conjonctif gingival ou bien par les cellules de l'os alvéolaire, pouvant conduire à des phénomènes de résorption radiculaire ou d'ankylose de la dent. Ces différents cas illustrent le processus de réparation et ne permettent donc pas la reconstruction d'un système d'attache performant et pérenne. L'objectif à atteindre, dans le cadre de la régénération parodontale, consiste à favoriser la colonisation de la surface radiculaire par les cellules du ligament parodontal afin d'obtenir une nouvelle attache conjonctive débouchant sur une régénération « ad integrum » des tissus parodontaux.

## 2. La maladie parodontale

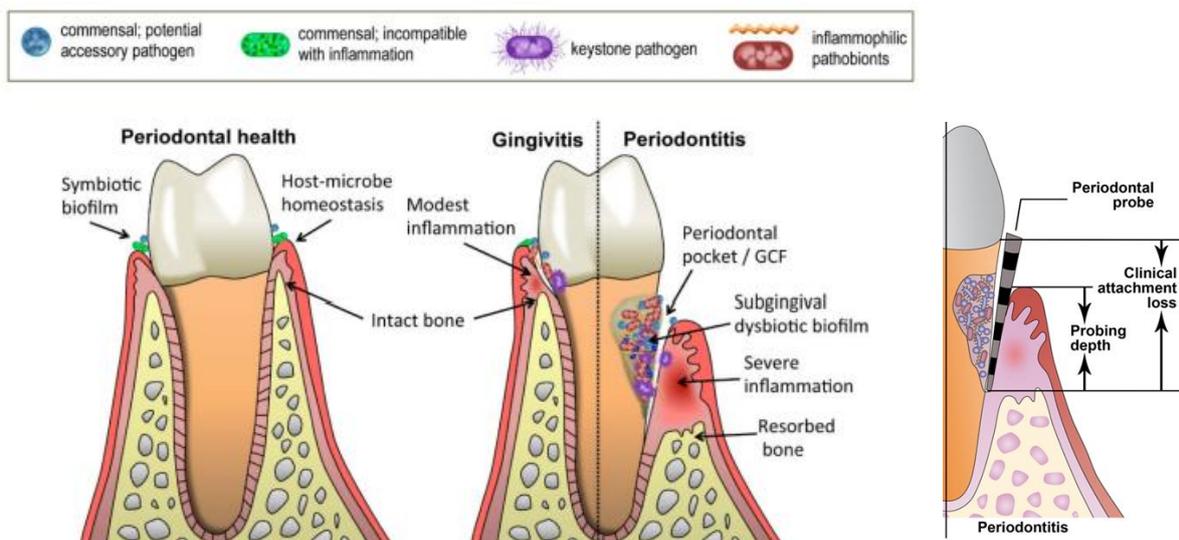
### A. Epidémiologie

La parodontite est définie comme étant une maladie inflammatoire chronique, à composante bactérienne, caractérisée par une destruction des tissus de soutien des dents, à savoir le parodonte. Il s'agit d'une pathologie complexe, multifactorielle, dont la survenue est corrélée à la susceptibilité de l'hôte, à la présence d'une flore microbienne pathogène, ainsi qu'à certains facteurs de risques. Parmi ces derniers, figurent le tabac, le diabète, la mauvaise hygiène bucco-dentaire, les facteurs génétiques, la prise de certains médicaments, l'alcool et le stress, entre autres. Les maladies parodontales se hissent actuellement au 6<sup>ème</sup> rang des maladies inflammatoires chroniques les plus répandues dans le monde. En France, 50% de la population entre 35-64 ans est atteinte de parodontite (16), tandis qu'à l'échelle mondiale la prévalence de la forme sévère de la maladie est estimée à 11% (17). De nombreuses études ont conclu à une association entre les maladies

parodontales et certaines maladies systémiques, en particulier dans le cas des maladies cardiovasculaires, du diabète, des maladies pulmonaires et des complications liées à la grossesse (18). Inversement, les pathologies générales aggraveraient l'évolution et la sévérité des parodontites dès lors qu'elles perturbent les réponses immuno-inflammatoires de l'hôte. Les parodontites sont ainsi associées à plus de 57 pathologies générales (19) et représentent un enjeu de santé majeur.

## B. Physiopathologie

La toute première étape du processus pathologique constitue la gingivite, souvent consécutive à un contrôle de plaque dentaire inefficace, entraînant une accumulation de bactéries au niveau de la muqueuse gingivale et conduisant ainsi au déclenchement d'une réaction inflammatoire du parodonte superficiel. Ce stade demeure réversible et il ne persiste pas de séquelles si la gingivite est traitée à temps. En effet, la notion d'homéostasie tissulaire dépend de l'équilibre entre les défenses de l'hôte d'une part, et les agressions microbiennes d'autre part. Les réponses de l'hôte mises en jeu pour faire face à ce « challenge » microbien jouent donc un rôle majeur dans la survenue et la sévérité de la maladie (20). Dans le cas où la gingivite évolue en parodontite, la rupture de l'épithélium favorise la migration du biofilm microbien vers le système d'ancrage (Figure 5). L'homéostasie du parodonte profond est alors perturbée, ce qui engendre une inflammation sévère. Par la suite, survient une résorption irréversible de l'os et du cément, associée à une désorganisation des fibres du ligament desmodontal au profit de l'apparition de poches parodontales, conduisant à une mobilité dentaire et, à terme, à la perte de la dent (21).



**Figure 5 :** Dysbiose microbienne et prédisposition de l'hôte à la réaction inflammatoire contribuent au développement de la parodontite ; d'après Hajishengallis et al. (22) et Ren et al. (23).

Les poches parodontales sont caractérisées par une perte d'attache clinique (Clinical attachment level or loss) et une profondeur de sondage (probing depth) marquée (Figure 5), c'est-à-dire supérieure à 3mm (European Federation of Periodontology 2019). Par convention, les lésions parodontales sont généralement classées en trois catégories selon le type de lésions osseuses mises en jeu. Il existe des lyses « supra-osseuses » ou horizontales, des lyses « infra-osseuses » (caractérisées par le nombre de parois osseuses restantes), encore qualifiées de lésions verticales ou angulaires, et des lésions inter-radicales, aussi appelées atteintes de la furcation. Plusieurs types de lésions peuvent être associés sur une même dent.

### C. Immuno-histopathologie

Les interactions étroites et perpétuelles entre le microbiote dysbiotique et l'épithélium jonctionnel peuvent être à l'origine d'une inflammation aigue du parodonte. Les bactéries et leurs toxines s'accumulent au niveau du sulcus et sont capables de migrer à travers l'épithélium jonctionnel afin d'envahir le tissu conjonctif gingival sous-jacent. Les cellules épithéliales, les fibroblastes, ainsi que les cellules immunitaires résidentes des tissus sont stimulés et reconnaissent les éléments pathogènes (PAMPs), dont les lipopolysaccharides (LPS), via leurs récepteurs TLR dans le but de les neutraliser (4). En réponse à cette invasion, ces cellules sécrètent des médiateurs pro-inflammatoires (IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-23, TNF- $\alpha$ ) afin de recruter, sur le site de l'infection, des leucocytes non résidents des tissus, dont les polynucléaires neutrophiles (24). La migration massive de ces derniers depuis l'épithélium jonctionnel vers le sulcus signe l'initiation de la lésion parodontale (25). Ces granulocytes neutrophiles participent à la phagocytose des éléments pathogènes et relarguent des élastases, dans le but de dégrader les protéines membranaires présentes sur les bactéries, ainsi que des composés cytotoxiques et des enzymes impliquées dans la dégradation (espèces réactives de l'oxygène et métalloprotéinases matricielles). Ce relargage est à l'origine de la rupture de l'élastine et du collagène de type I au sein du ligament desmodontal, ce qui rompt son attache au ciment et à l'os alvéolaire, conduisant ainsi à la formation d'une poche parodontale, associée à une destruction tissulaire d'origine inflammatoire (25,26).

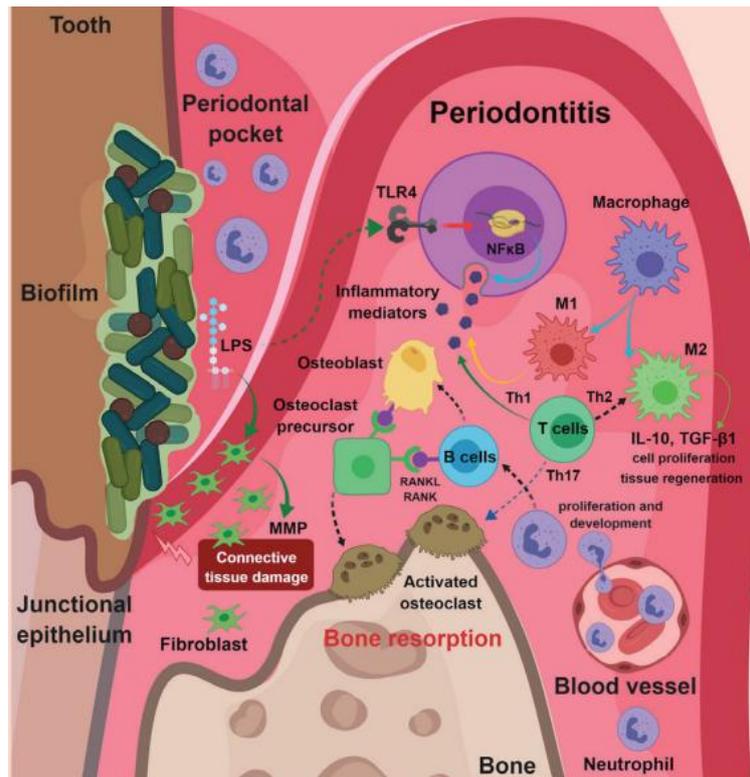
Par l'intermédiaire de la sécrétion des chimiokines CCL2 et CCL20, les polynucléaires neutrophiles induisent le recrutement des lymphocytes Th17 (impliqués dans les mécanismes inflammatoires et auto-immuns) sur le site lésé et favorisent également la prolifération et la différenciation des lymphocytes B en plasmocytes via la sécrétion des cytokines APRIL et BlyS (4). Ces granulocytes contribueraient ainsi à la survenue de la parodontite, non seulement en initiant la lésion mais également en participant à sa progression.

Les agents bactériens (tel que le LPS) et les cytokines de type 1 (dont l'IFN- $\gamma$ ) induisent la polarisation des macrophages vers le phénotype M1 (à caractère pro-inflammatoire) au détriment du phénotype M2 (à caractère anti-inflammatoire). Par conséquent, leurs capacités à phagocyter les microbes augmentent, associées à une expression élevée de molécules pro-inflammatoires et antimicrobiennes (24). En revanche, leur potentiel de phagocytose des cellules apoptotiques, dit « efferocytose », est réduit (20). La prédominance de macrophages au phénotype M1 demeure ainsi potentiellement associée à la maladie parodontale (4).

La persistance de la réponse inflammatoire est corrélée à l'envahissement des tissus parodontaux par les lymphocytes T et B provenant de l'immunité acquise. Les lymphocytes auxiliaires Th17 sont activés, au détriment des lymphocytes T régulateurs (Treg) aux propriétés immunosuppressives. Ils sécrètent le ligand RANKL (receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand), cytokine clé impliquée dans l'ostéoclastogénèse à l'origine de la résorption osseuse parodontale, ainsi que des cytokines pro-inflammatoires dont l'IL-17. Cette dernière stimule l'immunité innée et renforce le recrutement des polynucléaires neutrophiles, jouant ainsi un rôle majeur dans l'entretien et la chronicité de la réponse inflammatoire à l'origine du développement de la parodontite. Les lymphocytes B et T activés expriment massivement le ligand RANKL (à la fois sous forme membranaire et soluble) au sein de la lésion inflammatoire et constituent ainsi les principales

sources de ce dernier (exprimé par 90% des lymphocytes B et 50% des lymphocytes T des tissus atteints) (20).

Le ratio RANKL (inducteur de l'ostéoclastogénèse)/OPG (inhibiteur de l'ostéoclastogénèse) impliqué dans le contrôle de l'équilibre du métabolisme osseux est augmenté en faveur de RANKL. Ce dernier se fixe sur les récepteurs RANK des cellules ostéoclastiques et active le processus de résorption osseuse alvéolaire, caractéristique du stade de parodontite déclarée (26). Ainsi, l'ensemble des événements décrits concourent à la destruction irréversible du parodonte et à la progression de la maladie (Figure 6).



**Figure 6 :** Schéma récapitulatif des réponses immunitaires innée et acquise mises en jeu lors du processus de parodontite ; source : Muñoz-Carrillo et al. (4).

Comme l'illustre le tableau de synthèse réalisé à partir des articles de Hajishengallis *et al.* (20), Kourtzelis *et al.* (27) et Doran *et al.* (28) (Annexe 1), la destruction des tissus parodontaux survenant au cours de la maladie parodontale serait donc liée au caractère aberrant et dérégulé des réponses inflammatoires mises en jeu par les différents acteurs de l'immunité. A contrario, la résolution de l'inflammation et la préservation des tissus parodontaux reposeraient sur un équilibre précis faisant intervenir des réponses inflammatoires appropriées, à savoir finement régulées, coordonnées et transitoires dans le temps.

### 3. Traitements de la parodontite

#### A. Thérapeutiques conventionnelles

Les traitements actuels reposent, en premier lieu, sur une prise en charge de la maladie via une stratégie antibactérienne non chirurgicale, appelée débridement radiculaire non chirurgical. Cette

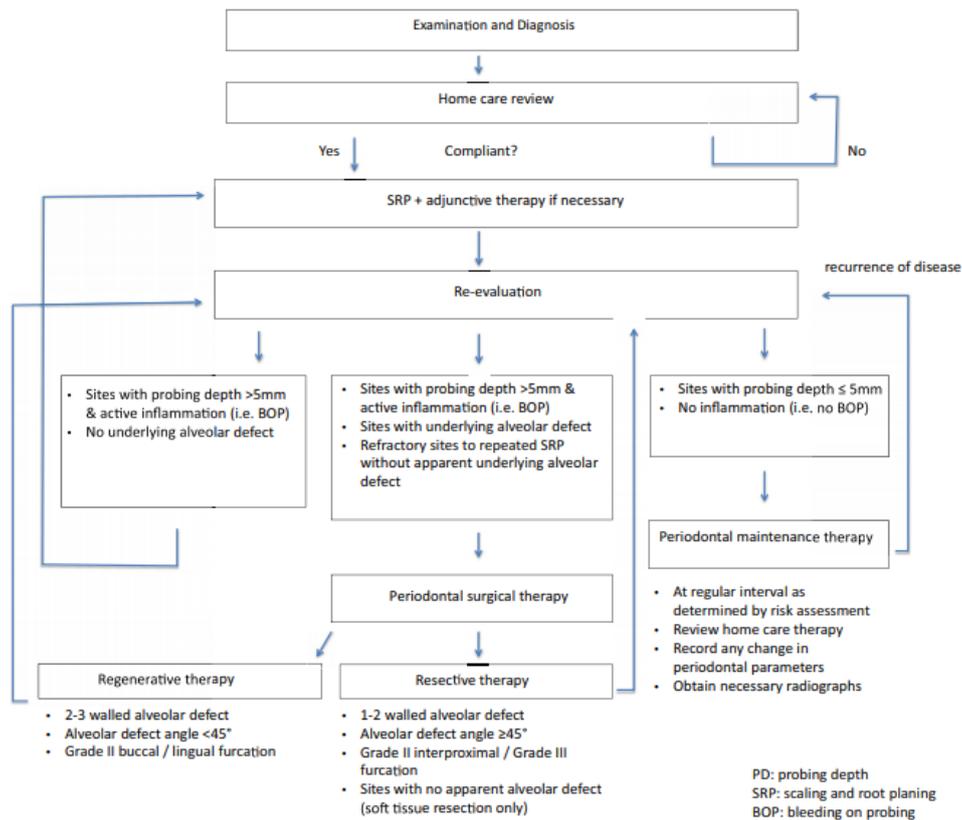
technique consiste à éliminer physiquement les bactéries fixées sur les dents et leurs racines. Des antibiotiques et des antiseptiques peuvent être associés à cette dernière afin d'en optimiser le résultat par leur action chimique. Le succès des traitements s'évalue cliniquement par une réduction de la profondeur de sondage (PD) et de l'indice de saignement au sondage (BOP), au profit d'un gain d'attache clinique (CAL). Un gain osseux peut également être visualisé radiologiquement. L'objectif étant le rétablissement d'un environnement parodontal sain permettant un contrôle de plaque dentaire efficace.

Si le résultat obtenu est jugé satisfaisant avec une réduction significative des poches parodontales (profondeur de sondage  $\leq 5$ mm) et disparition de l'inflammation locale, caractérisée par une absence de saignement au sondage, une maintenance parodontale est préconisée pour la suite, à intervalles réguliers (Figure 7).

Dans le cas où il y a persistance de sites avec poches parodontales dont la profondeur au sondage est supérieure à 5mm, en présence d'une inflammation active (saignement au sondage) lors de la réévaluation (4 à 6 semaines plus tard), le débridement est renouvelé en association à une thérapie complémentaire, si nécessaire (par exemple via l'utilisation d'antibiotiques).

Les sites présentant des poches parodontales  $> 5$ mm et étant associés à des altérations de l'os alvéolaire sous-jacent ou étant réfractaires aux débridements radiculaires successifs (sans altérations apparentes de l'os alvéolaire) sont, quant à eux, traités par thérapie chirurgicale (17).

Parmi les thérapeutiques parodontales chirurgicales, il existe les thérapies parodontales résectrices. Le principe de ces chirurgies consiste à réduire ou éliminer les lésions infra-osseuses (verticales) par la réalisation d'une ostéotomie/ostéoplastie. A la suite de cela, le tissu gingival est repositionné apicalement, à la hauteur correspondant à la crête alvéolaire remaniée. Par conséquent, les poches parodontales se trouvent réduites, voire éliminées, et le nettoyage du site peut ainsi se faire de manière facilitée afin d'éviter, à termes, de possibles récives. Cette technique va être généralement mise en œuvre pour des lésions osseuses alvéolaires impliquant 1 à 2 parois et/ou pour des lésions alvéolaires avec un angle  $\geq 45^\circ$  (Figure 7). Elle est également préconisée pour les sites avec poche parodontale profonde, sans altérations de l'os alvéolaire sous-jacent, pour lesquels seule une résection de la gencive est effectuée.



**Figure 7 :** Arbre décisionnel relatif au traitement de la parodontite ; source : Kwon et al. (17).

**Cependant, dans la plupart des cas, les traitements mis en œuvre ne permettent qu’une cicatrisation/réparation des tissus lésés, se traduisant par la formation d’un épithélium jonctionnel long, compromettant ainsi la régénération parodontale « ad integrum ».**

## B. Thérapeutiques régénératives

A ce titre, dans le domaine des thérapeutiques chirurgicales parodontales, l’émergence des thérapies régénératives du parodonte suscite de nombreux espoirs. L’objectif de ces thérapies est de remplacer et régénérer les tissus endommagés afin de restaurer à la fois l’architecture tissulaire du parodonte et sa fonction. Les thérapies régénératives sont basées sur différentes stratégies, avec des niveaux de succès variables, telles que les greffes osseuses (autogéniques, allogéniques, xénogéniques, et synthétiques ou alloplastiques) (29), la régénération tissulaire guidée reposant sur l’utilisation de membranes « barrières » (30), ou encore la régénération tissulaire induite. Cette dernière approche repose sur l’utilisation de facteurs bioactifs tels que les facteurs dérivés des plaquettes (PDGF), qui jouent un rôle essentiel dans la prolifération des cellules du ligament parodontal (31), ou encore les dérivés protéiques de la matrice de l’émail (EMD) (32). Leur mise en œuvre concerne principalement les lésions osseuses alvéolaires impliquant 2 à 3 parois et/ou des lésions alvéolaires dont l’angle est inférieur à 45° (Figure 7).

### a. Greffes osseuses/substituts osseux

De nombreux matériaux peuvent être utilisés pour les comblements osseux. Le choix de ces derniers est notamment fonction de la taille de la lésion osseuse, de sa forme et de son volume, des caractéristiques biologiques recherchées. Les substituts osseux se distinguent à la fois par leur

origine et par leurs propriétés intrinsèques d'ostéogénèse, et/ou d'ostéoinduction, et/ou d'ostéoconduction (33–35).

### ***b. Régénération tissulaire guidée***

Le concept de régénération tissulaire guidée (RTG) repose sur l'utilisation de membranes « barrières ». Une des qualités essentielles requises pour ces dernières demeure leur biocompatibilité. En effet, il est fondamental qu'elles ne soient pas à l'origine d'une réponse immunitaire ou d'une inflammation aigüe compromettant la phase de régénération. L'avantage majeur de l'utilisation de ces membranes, en plus de fournir un espace disponible à la régénération du parodonte profond, réside dans leur capacité à stabiliser le caillot sanguin, qui constitue un véritable réservoir nutritif, moteur de la régénération.

Les membranes utilisées pour cette technique de RTG se distinguent selon deux classes, les membranes non résorbables et les membranes résorbables. Par définition, les membranes non résorbables présentent des capacités plus élevées en termes de maintien de l'espace nécessaire au processus de régénération parodontale par comparaison aux membranes résorbables. En contrepartie, leur retrait nécessite une ré-intervention susceptible d'engendrer un retard de cicatrisation et d'altérer le processus de régénération parodontale. L'essor des membranes résorbables permet de s'affranchir de cette étape de ré-intervention chirurgicale et met en jeu une dégradation progressive du matériau (10,18).

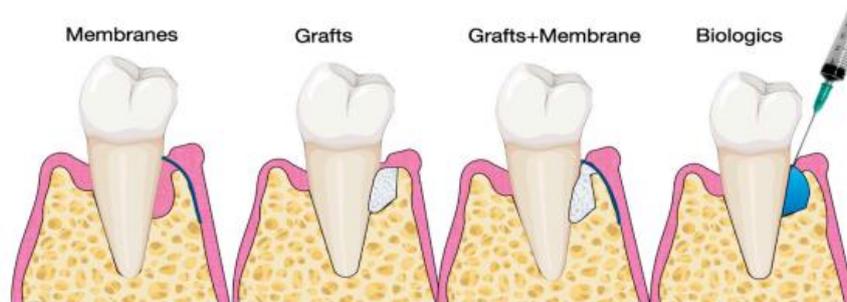
### ***c. Régénération tissulaire induite***

Le concept de régénération tissulaire induite (RTI) est basé sur l'utilisation de facteurs dits « bioactifs » dans le but de stimuler les cellules stromales mésenchymateuses présentes *in situ* afin de permettre leur prolifération et leur différenciation pour reconstituer les tissus parodontaux lésés. Parmi ces agents « bioactifs », les principaux actuellement commercialisés sont les dérivés protéiques de la matrice amélaire (EMD), le facteur de croissance dérivé des plaquettes (PDGF-BB), le facteur de croissance des fibroblastes (FGF-2) et les protéines morphogénétiques osseuses (BMP-2 et BMP-7) (36). Ces médiateurs moléculaires possèdent certaines propriétés favorisant le chimiotactisme, la prolifération et différenciation, ainsi que la synthèse de la matrice extracellulaire et l'angiogénèse.

Les dérivés protéiques de la matrice amélaire, d'origine porcine, ont été les premiers approuvés par la FDA dans le cadre de la régénération parodontale, et sont commercialisés sous le nom d'« Emdogain ». Leur composition comprend 90% d'amélogénines et 10% de protéines non amélogénines dont BMP-2 et BMP-7, le tout inclus dans un gel de propylène glycol (6,37). Selon la littérature, l'Emdogain représente actuellement le seul biomatériau capable d'aboutir à la reconstitution complète du ligament parodontal, d'un point de vue histologique (18). Il serait capable d'inhiber la prolifération des cellules épithéliales (38) et de conduire à l'élaboration de structures apparentées au ciment acellulaire, soulignant son rôle potentiel dans le processus de cémentogénèse. Bien que des études *in vivo* aient démontré des résultats prometteurs, y compris chez l'Homme, les dérivés protéiques de la matrice amélaire ont globalement induit une formation de ciment acellulaire variable et ainsi peu prédictible. Ce constat met en lumière la nécessité de nouvelles études pour approfondir nos connaissances sur le mécanisme d'action précis de l'EMD (36).

#### **d. Techniques combinées**

L'utilisation de techniques combinées peut également s'avérer utile, en fonction du contexte clinique, afin d'augmenter la probabilité de reconstruction/régénération des tissus parodontaux lésés, comme le montre le schéma ci-dessous (Figure 8) qui résume le principe des techniques de thérapie régénérative parodontale.



**Figure 8 :** Schéma récapitulatif des thérapies régénératives parodontales ; source : Mancini et al. (18).

#### **C. Résultats des techniques de régénération actuelles**

De nombreuses études soulignent l'intérêt des techniques régénératives dans la prise en charge des lésions parodontales. Ces dernières ayant démontré, de manière générale, des améliorations significatives des paramètres cliniques en termes de réduction de profondeur de sondage et de gain d'attache clinique par rapport aux thérapeutiques chirurgicales classiques telles que le lambeau d'assainissement (OFD), comme le rapportent les revues systématiques de Stavropoulos *et al.* (39) et de Nibali *et al.* (40). Le bénéfice de leur mise en œuvre répond à des indications précises et le recours à des techniques combinées peut s'avérer très intéressant bien qu'il puisse complexifier le degré de technicité de l'acte et, par conséquent, le risque de complications associées. L'efficacité de ces techniques s'évalue ainsi au cas par cas et dépend notamment d'autres facteurs décisionnels importants tels que le type et l'angle de la lésion osseuse, ou encore les facteurs esthétiques associés. De manière générale, ces thérapeutiques aboutissent à une régénération parodontale limitée et variable d'une situation à l'autre, avec des résultats globalement peu prédictibles. D'autre part, actuellement, aucune de ces approches ne sont prédictibles pour la régénération de lésions infra-osseuses à 1 paroi restante ou moins, de lésions furcatoires de classe III, ou de lésions supra-osseuses (lésions horizontale) (10,41).

La nécessité de développer de nouvelles approches régénératives améliorant l'efficacité, la prédictibilité et la simplicité de mise en œuvre des traitements repose sur une vision plus globale de la maladie parodontale prenant en compte les notions d'inflammation, d'infection résiduelle et de retour à l'homéostasie tissulaire. Les difficultés actuelles à gérer la reconstruction fiable et pérenne des tissus parodontaux justifient ainsi l'attrait de la thérapie cellulaire pour appréhender la maladie dans son ensemble, en s'intéressant notamment à deux paramètres fondamentaux que sont le microenvironnement et l'immuno-modulation.

## 4. Thérapie cellulaire du parodonte

### A. Une approche prometteuse

Le contexte d'inflammation chronique persistante et d'infection résiduelle relatif à la maladie parodontale s'avère particulièrement délétère à la reconstruction des tissus parodontaux lésés. Les effecteurs de l'immunité innée et acquise, étant le siège d'importantes dérégulations, concourent à des réponses inflammatoires exacerbées et anarchiques, suscitant ainsi un intérêt majeur pour les approches visant à engendrer un « reset » immunitaire et à rétablir un microenvironnement parodontal propice à la régénération tissulaire.

A ce titre, la thérapie cellulaire basée sur l'utilisation de cellules souches/stromales mésenchymateuses (MSC) constitue une approche régénérative très attrayante, axée sur le retour vers l'homéostasie tissulaire, la rééducation du microenvironnement et l'immunomodulation. Au cours des dernières années, l'utilisation des MSC a été largement étudiée en médecine régénérative, notamment dans le domaine dentaire (26,42,43).

Le potentiel thérapeutique des MSC repose non seulement sur leurs propriétés de différenciation multipotente, à des fins de remplacement des tissus endommagés, et, à fortiori, sur leur capacité à réguler les fonctions d'autres types cellulaires, ainsi qu'à moduler le milieu inflammatoire local. L'activité des MSC se décline selon différents modes d'action, principalement via un mécanisme de communication paracrine (interaction indirecte avec les cellules cibles via la sécrétion de médiateurs solubles) ainsi que par un mécanisme d'interaction cellulaire directe, leur permettant d'exercer leurs fonctions immunomodulatrices, pro-angiogéniques, anti-apoptotiques, anti-fibrotiques, anti-oxydantes et anti-bactériennes (44–46). Elles possèdent également la capacité d'interagir avec les cellules cibles par relargage de vésicules extracellulaires ainsi que par transfert mitochondrial (Figure 9).

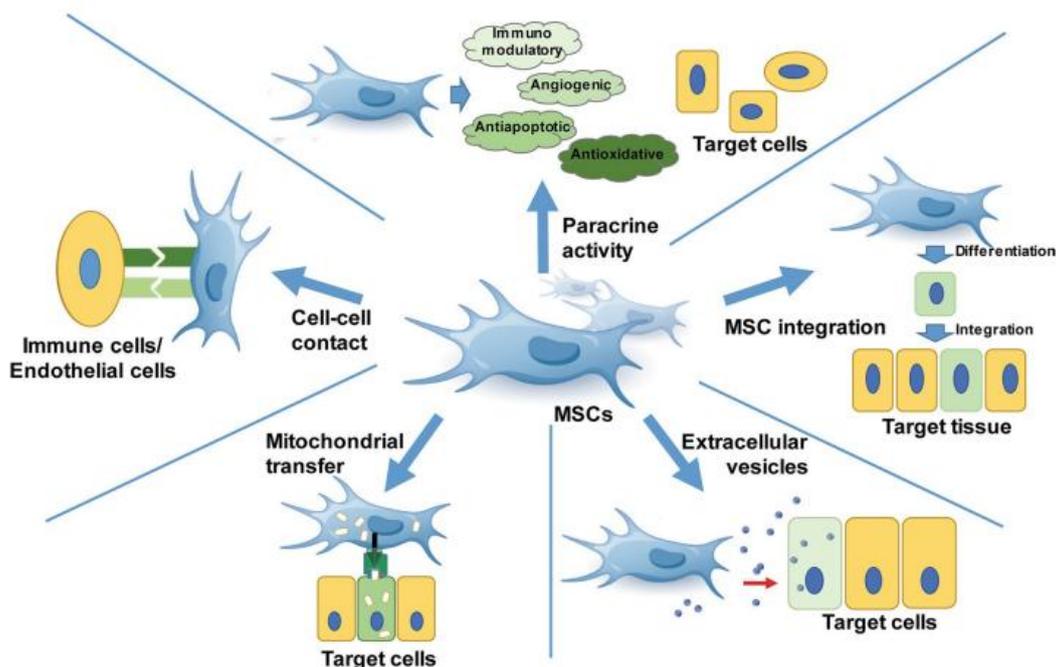


Figure 9 : Potentiel thérapeutique des MSC ; source : Fan et al. (44).

Les MSC possèdent des effets immunomodulateurs multiples qui s'exercent à la fois sur les cellules de l'immunité innée et acquise. Elles jouent un rôle central lors de processus inflammatoires en orientant leur activité vers des propriétés immunosuppressives. Leur action se traduit donc, au sein des cellules cibles, par une réduction des capacités de phagocytose et de présentation antigénique des phagocytes, ainsi que par une modification du profil des effecteurs de l'immunité vers des phénotypes régulateurs (cellules dendritiques régulatrices, macrophages à caractère anti-inflammatoire de type M2, Treg, Breg) (44,47,48) aboutissant à une diminution de la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires associée à une augmentation de la production de molécules anti-inflammatoires (Figure 10).

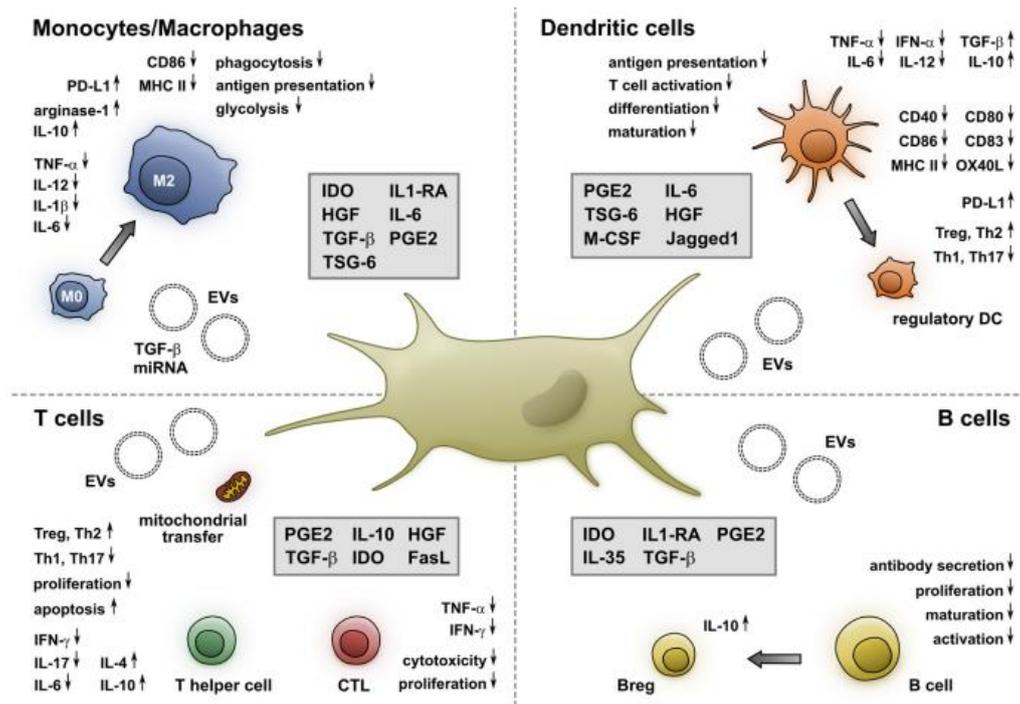
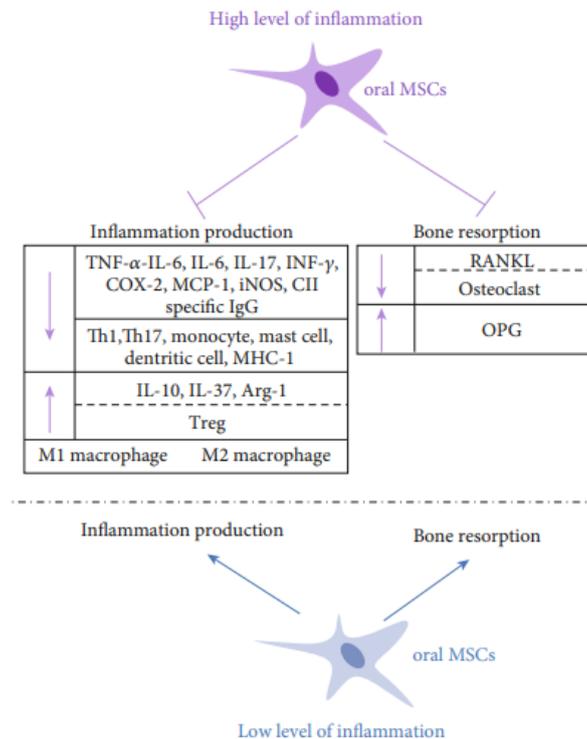


Figure 10 : Effets immunosupresseurs des MSC ; source : Müller et al. (47).

Les MSC constituent ainsi de véritables senseurs du microenvironnement local, capables d'adapter leurs propriétés immunomodulatrices suivant le niveau inflammatoire perçu afin de maintenir ou de restaurer l'homéostasie tissulaire. Le mécanisme mis en jeu fait appel à un rétrocontrôle dépendant de la concentration en cytokines inflammatoires du milieu. Ainsi, dans un contexte peu inflammatoire avec de faibles concentrations en TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$  et IL-6, principales cytokines pro-inflammatoires, l'activité des MSC est orientée vers des fonctions immunostimulatrices favorisant les réponses inflammatoires et le processus de remodelage osseux physiologique. En revanche, lorsque les concentrations de ces cytokines augmentent et dépassent un certain seuil, traduisant un contexte inflammatoire important, les MSC évoluent d'un phénotype pro-inflammatoire vers un phénotype anti-inflammatoire et acquièrent des fonctions immunosuppressives via un processus appelé « Licensing » (47,48). Ce processus est caractérisé par la sécrétion massive d'un facteur immunosuppresseur essentiel, l'Indoleamine 2,3-dioxygénase (IDO), via les MSC activées en réponse aux niveaux élevés de TNF- $\alpha$  et d'IFN- $\gamma$ . Ainsi, l'élévation de la concentration en IDO agirait comme un véritable interrupteur à l'origine de la transition des propriétés immunostimulatrices des MSC vers des propriétés immunosuppressives (49). Par conséquent, les MSC inhibent la production de médiateurs pro-inflammatoires en favorisant celle des

effecteurs anti-inflammatoires, et s'opposent notamment au processus de résorption osseuse. Ces événements concourent à la résolution du processus inflammatoire et permettent, de ce fait, d'éviter la survenue de réactions immunitaires délétères (Figure 11), rendant ainsi le microenvironnement propice à l'homéostasie et à la reconstruction tissulaire.



**Figure 11** : Adaptation des effets immunomodulateurs des MSC en réponse au contexte inflammatoire local pour assurer le maintien de l'homéostasie tissulaire ; source : Zhou et al. (48).

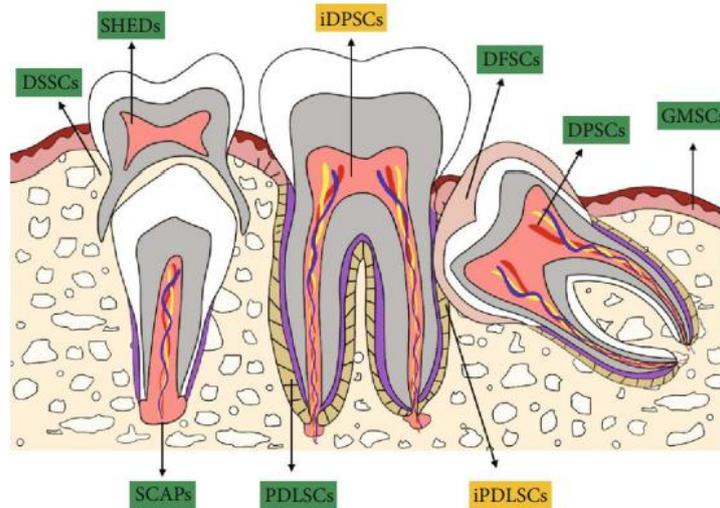
Dans un contexte de parodontite, la réaction inflammatoire mise en jeu ne répond plus au schéma classique de processus inflammatoire aigu, de durée transitoire, avec sa phase d'initiation puis sa phase de résolution, mais se traduit plutôt par un processus inflammatoire chronique à caractère persistant. Dans ce cadre, les fonctions immunomodulatrices et les capacités de différenciation ostéogénique des MSC endogènes sont altérées, pouvant conduire à la persistance de l'inflammation et à la destruction osseuse. Les voies de signalisation relatives au TNF- $\alpha$  et au NF- $\kappa$ B sont continuellement activées, à bas bruit, perturbant le comportement des MSC endogènes au sein de leur niche et induisant la différenciation et l'activation des ostéoclastes (45). L'accumulation massive d'espèces réactives de l'oxygène et le stress oxydatif, associés au processus inflammatoire chronique, engendrent des altérations au sein des MSC endogènes, pouvant les mener vers un état de sénescence précoce. Ainsi, leurs capacités de prolifération et de différenciation mais également de migration et recrutement sur site sont compromises (50). Elles acquièrent un phénotype particulier, nommé « phénotype sécrétoire associé à la sénescence » (SASP), leur conférant un statut pro-inflammatoire (51). L'accumulation de cellules sénescents facilite l'infiltration massive de cellules immunitaires au sein du microenvironnement et participe à l'entretien de l'état inflammatoire chronique (52). Dans ces conditions, la sénescence induite des MSC endogènes contribuerait à la détérioration de l'environnement parodontal en exacerbant l'inflammation locale, accentuant le remodelage de la matrice extracellulaire et diminuant les capacités de régénération tissulaire (53).

La greffe de cellules souches mésenchymateuses *in situ* représente ainsi une stratégie de choix dans le cadre de la parodontite, exerçant des fonctions de néovascularisation, d'immunomodulation et de régénération tissulaire (54,55). A ce titre, les MSC possèdent une caractéristique particulièrement intéressante, à savoir leur phénotype hypo-immunogénique rendant possible la transplantation de MSC allogènes sans nécessiter la mise en place d'une quelconque immunosuppression associée (56). Cette propriété est fondamentale car la greffe de MSC autologues se heurte à certaines limites. En effet, les fonctions des MSC diminuent avec l'âge et peuvent être négativement impactées par certains facteurs du microenvironnement ainsi que par des maladies systémiques ou des désordres métaboliques généraux (obésité, diabète de type 2,...) (57), suggérant un manque d'efficacité potentiel de l'utilisation des MSC autologues chez les patients âgés et/ou atteints de comorbidités. Le recours aux MSC allogènes permet de s'affranchir de ces contraintes. Dans ce cas, afin de pallier l'hétérogénéité des prélèvements entre donneurs, des pools de MSC allogènes provenant de donneurs différents sont constitués. Ainsi, le modèle de greffe de MSC allogéniques apparaît comme l'approche la plus efficace et la plus pertinente pour le développement de la thérapie cellulaire à grande échelle (58).

Bien qu'il soit important de poursuivre les recherches sur le long terme, à ce jour, de nombreuses études penchent en faveur de l'innocuité des greffes de cellules souches mésenchymateuses (59). A ce titre, l'utilisation de MSC allogènes a déjà été testée dans le cadre de la maladie de Crohn, de régénération cardiaque et de malformations crâniennes, et a été très bien tolérée (41,60). La transplantation de MSC allogènes apparaît ainsi comme une approche raisonnée et prometteuse dans le cadre de la régénération tissulaire, notamment parodontale.

## **B. Différents types de cellules souches mésenchymateuses**

Parmi les principales sources de MSC, il existe deux grandes catégories : les cellules souches « odontogènes » (Figure 12) ou « non odontogènes », ces dernières étant majoritairement représentées par les BMSC (Bone marrow stem cells) et les ASC (Adipose-derived stem cells). Le choix du type de MSC est un paramètre essentiel à considérer car, bien que ces cellules partagent des propriétés communes, il demeure des différences marquées quant à leurs caractéristiques précises (taux de prolifération, capacités de différenciation, aptitude à résister au microenvironnement pathologique, etc.), pouvant grandement influencer les perspectives cliniques de la régénération parodontale (56).



**Figure 12 :** Principaux types de cellules souches mésenchymateuses « odontogènes ». PDLSCs : periodontal ligament stem cells ; DFSCs : dental follicle stem cells ; DPSCs : dental pulp-derived stem cells ; SCAPs : stem cells from apical papilla ; SHEDs : stem cells from exfoliated deciduous teeth ; GMSCs : gingival mesenchymal stem cells ; DSSCs : dental socket-derived stem cells ; iPDLSCs : PDLSCs derived from infected tissue ; iDPSCs : DPSCs derived from infected tissue ; source : Wang et al. (26).

Les MSC odontogènes constituent, par nature, de bons candidats pour la régénération parodontale. Cependant, en pratique, les quantités récoltées restent très limitées et dépendent d'extractions dentaires ou de gingivectomies, ce qui restreint leur application (54,61). De plus, bien que les PDLSC soient reconnues comme étant la source cellulaire de référence en termes de régénération parodontale, ces dernières demeurent particulièrement vulnérables aux microenvironnements inflammatoires/pathologiques. En effet, leurs capacités de différenciation ostéogénique *in vitro* et de formation osseuse *in vivo* peuvent être plus facilement altérées en comparaison avec d'autres types de MSC (62). Il apparaît donc crucial de disposer d'autres sources de MSC, et les MSC non odontogènes, présentant une morphologie et un immuno-phénotype similaire aux PDLSC (63), offrent en ce sens une alternative intéressante. Les BMSC font ainsi partie des sources cellulaires les plus étudiées, à ce jour, en thérapie régénérative du parodonte, donnant lieu à des résultats encourageants (41), tandis que l'utilisation des ASC tend à s'imposer dans ce domaine.

### **C. Les ASC (Adipose-derived stem cells) : source de choix pour une régénération parodontale « ad integrum »**

Les ASC, découvertes en 2001 par Zuk *et al.*, proviennent de différents tissus adipeux (abdomen, hanche, bras, menton) et sont récoltées selon des techniques de lipectomie ou de liposuction (55). Ce réservoir cellulaire présente plusieurs avantages dont une quantité abondante d'ASC (représentant au minimum 2% de sa fraction stromale vasculaire ; pourcentage de MSC le plus élevé de tous les tissus), une certaine facilité d'accès, associée à un prélèvement peu invasif, et des procédés d'isolation simples (56,62). A titre comparatif, pour un prélèvement de quantité équivalente par ponction de moelle osseuse, environ 500 fois plus de MSC sont retrouvées au sein du tissu adipeux, suggérant l'utilisation des ASC comme une excellente alternative à celle des BMSC (64,65). Les ASC présentent un potentiel de différenciation ostéogénique, chondrogénique, adipogénique, myogénique, cardiogénique et neurogénique (41,56). Leur aptitude à la régénération osseuse *in vivo* et leurs capacités immunomodulatrices *in vitro* se sont révélées supérieures à celles

des BMSC et les ASC sont désormais considérées comme ayant les propriétés immunosuppressives les plus importantes parmi les différentes sources de MSC testées (57). Leur sécrétome comprend également une large gamme de facteurs angiogéniques, ainsi préféré au sécrétome des BMSC dans le cadre de la régénération tissulaire (46). Par conséquent, leurs nombreux atouts pourraient leur permettre de tenir le rôle principal dans la médecine régénérative du 21<sup>ème</sup> siècle (56).

Ceccarelli *et al.* (57) ont démontré l'intérêt des thérapies basées sur l'utilisation des ASC dans diverses pathologies en rapportant pour chacune les mécanismes potentiels mis en jeu *in vivo*, suscitant ainsi de réels espoirs pour le traitement des maladies inflammatoires et auto-immunes (Annexe 2). De manière plus spécifique, chez l'animal, la transplantation d'ASC au sein de défauts parodontaux a permis de favoriser la régénération d'os, de ciment et de fibres desmodontales, tout en améliorant la vascularisation du parodonte (7,41,65–69).

Abbo *et al.* (70) ont réalisé la première étude incluant une analyse comparative d'ASC provenant d'un grand nombre de donneurs et ont montré que leurs propriétés *in vitro* et *in vivo* demeuraient similaires et maintenues malgré le processus de vieillissement. Les ASC possèdent également la particularité de démontrer une maintenance fonctionnelle dans diverses conditions pathologiques osseuses, notamment via la préservation de leur viabilité cellulaire, de leurs capacités de différenciation et, plus généralement, de leur efficacité thérapeutique. Ainsi, les ASC provenant de donneurs âgés et atteints d'ostéoporose maintiennent leur métabolisme énergétique, leurs propriétés antioxydantes et immunomodulatrices, y compris leurs capacités régénératives osseuses lorsqu'elles sont greffées *in vivo* (62). Ces caractéristiques témoignent de la robustesse et de la fiabilité des ASC, par comparaison aux autres types cellulaires, et notamment de leur plus grande aptitude à résister aux microenvironnements pathologiques.

Les ASC présentent également une large gamme d'activités antibactériennes, orientée vers des effets essentiellement bactéricides, s'exerçant via leurs capacités de phagocytose, de sécrétion de radicaux libres oxygénés ainsi que de molécules antimicrobiennes. Ces cellules partagent l'expression commune d'un grand nombre de gènes avec les macrophages et sont capables d'internaliser les bactéries GRAM+ et GRAM- dans leurs phagolysosomes. Leur action antibactérienne est fortement dépendante du contact cellulaire conduisant à la perméabilisation des membranes bactériennes, entraînant ainsi une diminution de la croissance et de la viabilité des bactéries et une sensibilisation de ces dernières aux antibiotiques (71). Ces propriétés antibactériennes pourraient donc être très bénéfiques au processus de régénération tissulaire, se déroulant dans un microenvironnement où les bactéries résiduelles peuvent être résistantes ou peu sensibles aux antibiotiques. Par conséquent, la transplantation d'ASC apparaît tout à fait pertinente dans un contexte tissulaire immuno-dysbiotique tel que retrouvé lors de parodontite.

## **5. Modèles d'étude des interactions cellulaires en ingénierie tissulaire du parodonte**

### **A. De la thérapie cellulaire vers l'ingénierie tissulaire**

Selon la littérature, la transplantation de MSC sous forme de suspension cellulaire n'apparaît pas être une méthode pertinente dans le cadre de la régénération parodontale. En effet, l'utilisation de MSC en suspension montre un potentiel thérapeutique limité car cette configuration 2D s'avère très éloignée de leur environnement natif (3D) au sein de leur niche et que les MSC demeurent ainsi très

exposées au microenvironnement parodontal pathologique du receveur (57). A ce titre, l'injection directe de MSC en suspension au sein des tissus lésés est corrélée à un faible taux de survie cellulaire, une élimination rapide des cellules greffées, ainsi qu'à des problèmes de diffusion cellulaire en dehors du site endommagé concourant à une perte de contrôle de la destinée des cellules post-greffe (10,46,72).

Dans ce contexte, l'essor de l'ingénierie tissulaire reposant sur la triade : cellules - biomatériaux, vecteurs - facteurs de croissance, molécules de signalisation - représente une avancée majeure permettant la création de substituts biologiques ou de structures 3D biomimétiques, capables de préserver voire de potentialiser les propriétés des MSC, afin de favoriser la néoformation tissulaire post-transplantation (60). Dans le cadre de la régénération parodontale, les vecteurs jouent le rôle de « niche » pour les cellules afin de recréer un environnement favorable et protecteur, renforçant notamment la résistance des MSC vis-à-vis du microenvironnement parodontal pathologique du receveur (57). Ils sont destinés à mimer les propriétés physiques et chimiques de la matrice extracellulaire naturelle des tissus parodontaux. Leurs caractéristiques sont ainsi influencées par les propriétés des tissus cibles à régénérer, et tiennent également compte du type de lésion parodontale. Ces vecteurs ont pour vocation de favoriser et de guider l'adhésion, la prolifération, la migration et la différenciation des cellules transplantées (41,73). Leur utilisation rend ainsi possible la mise au point de microenvironnements spécifiques et instructifs bénéfiques aux MSC, notamment via leur association à des facteurs de croissance ou molécules de signalisation dans le but d'optimiser les capacités régénératives des MSC greffées et de recruter les cellules souches endogènes présentes à proximité (41,62).

Le tableau de Liang *et al.* (10) (Annexe 3) récapitule les principaux biomatériaux utilisés en tant que vecteurs dans le cadre de la régénération tissulaire parodontale. Selon la littérature, les biomatériaux polymères exerçant de faibles forces mécaniques (tels que le collagène, la gélatine, le chitosane) se sont illustrés comme étant les candidats de choix pour stimuler la régénération du ligament parodontal. En revanche, pour la régénération de l'os et du ciment, ce sont les biomatériaux inorganiques présentant d'importantes forces mécaniques, tels que l'hydroxyapatite (HA), le phosphate tricalcique (TCP), le phosphate de calcium biphasique (BCP) et les verres bioactifs (BG), qui s'avèrent être les plus prometteurs. Par conséquent, la conception de biomatériaux composites comprenant des polymères associés à des composés inorganiques constitue une stratégie pertinente pour optimiser la régénération du complexe parodontal (72). En ce sens, les hydrogels peuvent se montrer très utiles. Bien que leurs propriétés mécaniques initiales soient faibles, il est possible de les renforcer par incorporation de composés inorganiques type phosphate de calcium (10). Ce sont des vecteurs capables de recréer de nombreuses caractéristiques propres aux matrices extracellulaires natives ainsi que de délivrer des nutriments et des facteurs de croissance (74). Ils permettent les greffes de MSC sans risque de dispersion cellulaire et présentent l'avantage de pouvoir s'ajuster à la forme des défauts parodontaux irréguliers (73).

## **B. Modèles précliniques *in vivo* chez l'animal**

La transplantation de MSC, basée sur l'ingénierie tissulaire, a montré des résultats prometteurs chez l'animal dans le cadre de la régénération parodontale (Annexe 4). A ce titre, des séries de cas et des études de cas ont déjà été menées chez l'Homme avec notamment quelques rares essais cliniques

contrôlés en faveur de résultats encourageants quant à l'efficacité et à l'innocuité de l'approche (75–77).

L'ensemble des articles du tableau d'Iwasaki *et al.* (75) (Annexe 4), récoltés sur les vingt dernières années, met en évidence de solides arguments en faveur de la régénération du parodonte profond et souligne la diversité des méthodologies employées concernant la conception des modèles animaux expérimentaux (choix de la source et de l'origine des MSC pouvant être autologue, allogénique ou xénogénique, du type d'animal, du vecteur utilisé, du type de défaut parodontal étudié y compris de la méthode mise en jeu pour le générer) (63). Ces nombreux paramètres peuvent rendre la comparaison des études difficile et indiquent, qu'à l'heure actuelle, il n'existe pas de protocole spécifique qui pourrait être considéré comme supérieur aux autres en termes de régénération parodontale (41). Comme illustré sur le tableau (Annexe 4), le chien, le cochon nain, les rongeurs (rat essentiellement) et, plus rarement, le mouton, font partie des types d'animaux les plus utilisés dans le cadre de la maladie parodontale. Le chien et le cochon nain constituent les modèles qui reflètent le mieux l'étiopathologie de la parodontite humaine notamment via la morphologie de leurs dents et l'anatomie de leur région parodontale, proches de celles de l'Homme (54). Contrairement aux autres modèles, ils possèdent également la particularité de développer spontanément des parodontites à partir d'un certain âge (78). Selon les études recensées, la période d'observation s'est étalée de 3 à 24 semaines post-transplantation et les méthodes mises en œuvre pour quantifier la régénération des tissus parodontaux ont principalement reposé sur des techniques histologiques et histomorphométriques, sur des analyses radiologiques, immunohistochimiques, ainsi que sur des mesures cliniques (niveau d'attache clinique, profondeur de poche, récession gingivale, saignement au sondage).

Bien que la transplantation de MSC, basée sur l'ingénierie tissulaire, démontre un potentiel thérapeutique considérable dans le cadre de la régénération parodontale, il existe finalement très peu d'informations sur les mécanismes mis en jeu ainsi que sur le devenir des cellules greffées. En effet, parmi l'ensemble des 43 articles cités dans le tableau (Annexe 4), seules 8 publications se sont intéressées au suivi des MSC transplantées afin d'évaluer leur contribution au processus de régénération parodontale (Tableau 1). Une étude supplémentaire sur la greffe d'ASC, menée par Lemaitre *et al.* (69) au sein d'un modèle pertinent de parodontite induite par gavage oral de bactéries (pathogènes parodontaux) chez la souris, a été décrite et fournit de nouvelles perspectives dans ce contexte.

**Tableau 1** : Etude du devenir des MSC transplantées au sein des modèles animaux précliniques et de leur contribution au processus de régénération parodontale :

Auteur	Marquage des MSC transplantées - Analyses complémentaires	Résultats - Conclusion
<p><b>Hasegawa et al. (2006)</b> (79)</p>	<p>- <u>Marquage GFP</u> - Analyses immunohistochimiques de la localisation de la GFP et de PCNA (marqueur de prolifération cellulaire) pour obtenir des informations sur la différenciation des MSC.</p>	<p>- A 4 semaines post-greffe : présence de cellules GFP+ retrouvées dans l'ensemble des lésions parodontales. - Cémentoblastes, ostéoblastes, ostéocytes et fibroblastes des tissus parodontaux régénérés sont positifs à la GFP et montrent un marquage faible au PCNA. Les tissus parodontaux ainsi régénérés dérivent largement des MSC transplantées. - Immunohistochimie via PCNA suggère que les MSC sont présentes à des stades variés de différenciation. <b>- Les MSC transplantées seraient capables de survivre et de se différencier en cellules parodontales jusqu'à 4 semaines post-transplantation, conduisant à l'amélioration de la régénération parodontale.</b></p>
<p><b>Iwasaki et al. (2019)</b> (80)</p>	<p>- <u>Marquage PKH26</u> (fluorochrome s'intercalant dans les lipides des membranes cellulaires) - Détection par PCR de la séquence humaine Alu via isolement d'échantillons d'ADN génomique à partir de coupes de défauts parodontaux à J3 / J7 / et J28 post-greffe. - Etude de la localisation des hPDLSC greffées et de l'ADN génomique humain sur des coupes tissulaires de rat obtenues à différents temps du processus de cicatrisation, pour estimer la contribution des PDLSC greffées à la régénération parodontale.</p>	<p>- A 4 semaines post-greffe : cellules PKH26+ détectées au niveau de la surface externe de l'os alvéolaire régénéré et un petit nombre sont disséminées dans l'espace ligamentaire (pour 1 des rats, quasiment plus de cellules greffées observées). Cependant, la grande majorité des tissus parodontaux régénérés comprend des cellules PKH26 -. - Séquence humaine Alu est légèrement diminuée à J28 d'où le nombre de hPDLSC greffées baisse avec le temps. Les hPDLSC induisent la régénération tissulaire mais la majorité des tissus néoformés ne provient pas des cellules greffées elles-mêmes, effet indirect privilégié. <b>- Nombre limité de cellules greffées détecté dans les défauts parodontaux à 4 semaines post-transplantation et le greffon cellulaire à proprement parler n'a pas été retrouvé. Ces données suggèrent un nouveau scénario de régénération parodontale via la transplantation de PDLSC, autre que la prise de greffe, la croissance et la différenciation des MSC transplantées.</b></p>
<p><b>Liu et al. (2008)</b> (81)</p>	<p>- <u>Marquage GFP</u> - Observation de coupes non décalcifiées au microscope optique afin d'identifier les ostéoblastes et les lacunes osseuses dans l'os néoformé. Dans le même champ visuel, les PDLSC GFP+ sont observées au microscope à fluorescence. Les images sont ensuite superposées.</p>	<p>- A 12 semaines post-greffe : les positions de certaines cellules GFP+ chevauchent les ostéoblastes et les lacunes osseuses indiquant que les PDLSC GFP+ se sont différenciées en ostéoblastes <i>in vivo</i>. - Dans les champs visuels observés, plus de 50% des ostéoblastes apparaissent comme cellules GFP+. <b>- A 12 semaines post-greffe, les cellules GFP+ sont présentes dans l'os alvéolaire néoformé et se sont différenciées en ostéoblastes suggérant la contribution à la régénération parodontale <i>in vivo</i>.</b></p>
<p><b>Menicanin et al. (2014)</b> (82)</p>	<p>- <u>Marquage BrdU</u> - Immunodétection de BrdU et analyse de l'expression des marqueurs BSP / OPN / COL-1/ <math>\alpha</math>-SMA au sein des tissus régénérés. (BSP et OPN = marqueurs de la lignée ostéo-cémentogénique, et <math>\alpha</math>-SMA = marqueur de la lignée endothéliale, aussi retrouvé au sein des myofibroblastes).</p>	<p>- A 8 semaines post-greffe : cellules BrdU+ retrouvées bordant les couches de ciment néoformées ou piégées au sein des structures minéralisées et entourant le tissu fibreux et le réseau vasculaire. - Les cellules bordant les tissus cémentaires et ostéoïdes expriment les marqueurs COL-1 / BSP / OPN, tandis que celles associées au réseau vasculaire expriment <math>\alpha</math>-SMA. - Un ensemble de PDLSC greffées se sont différenciées en cellules de la lignée ostéo-cémentogénique, fibroblastes et péricytes, tandis qu'une partie reste indifférenciée maintenant un phénotype immature et donnant naissance à une population de MSC filles. <b>- A 8 semaines post-greffe, les PDLSC BrdU+ contribuent à la régénération tissulaire incluant os alvéolaire, ciment, tissu fibreux, fibres de Sharpey, vaisseaux sanguins, et sont capables de se différencier en ostéoblastes et cémentoblastes fonctionnels. Les PDLSC survivantes ne présentent pas un turnover cellulaire élevé <i>in vivo</i>, comme le démontre leur rétention de BrdU. Elles pourraient ainsi être capables de contribuer à la maintenance et à l'homéostasie à long-terme des tissus parodontaux régénérés.</b></p>

<p><b>Tsumanuma et al. (2016)</b> (83)</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- <u>Marquage eGFP</u></li> <li>- Détection par PCR de la séquence eGFP via isolement d'échantillons d'ADN et d'ARN à partir de coupes de défauts parodontaux.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Incapacité à détecter la protéine eGFP par immunohistochimie ; la procédure de décalcification longue à l'aide d'un acide fort pourrait avoir causé la disparition de la protéine eGFP (perte du marquage).</li> <li>- A 8 semaines post-greffe, ARN messenger et ADN génomique de l'eGFP sont retrouvés dans les tissus du groupe allogénique.</li> <li>- <b>A 8 semaines post-greffe, les amplicons d'eGFP retrouvés montrent que les PDLSC allogènes greffées restent vivantes ou au moins contiennent les transcrits d'eGFP.</b></li> </ul>
<p><b>Wei et al. (2010)</b> (84)</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- <u>Marquage BrdU</u></li> <li>- Evaluation de la survie, migration, différenciation des MSC greffées par double immunohistochimie (BrdU / ostéocalcine et BrdU / <math>\alpha</math>-SMA) ainsi que par une combinaison entre immunohistochimie et hybridation <i>in situ</i> (sondes d'hybridation cbfa-1 marquées à la digoxigénine).</li> <li>- <math>\alpha</math>-SMA = marqueur des fibroblastes du ligament parodontal et des cellules endothéliales.</li> <li>- Ostéocalcine = synthétisée exclusivement par les cellules ostéoblastiques lors du stade tardif de maturation.</li> <li>- Cbfa-1 = marqueur précoce de différenciation ostéogénique.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- A 6 semaines post-greffe : cellules BrdU+ abondantes dans ligament parodontal / os alvéolaire / ciment / vaisseaux sanguins. Cela démontre que quelques MSC transplantées survivent dans les lésions parodontales au moins jusqu'à 6 semaines et migrent largement au sein des tissus parodontaux.</li> <li>- <u>Double marquage immunohistochimique</u> : a indiqué que quelques cellules BrdU+, dans le ligament parodontal et les parois vasculaires, exprimaient le marqueur fibroblastique et endothélial <math>\alpha</math>-SMA. De plus, certaines cellules BrdU+, dans l'os alvéolaire, co-expriment l'ostéocalcine.</li> <li>- <u>Avec immunohistochimie et hybridation <i>in situ</i></u> : Détection de cellules BrdU+ avec co-expression de cbfa1 confirme qu'une proportion des MSC greffées se différencie en ostéoblastes.</li> <li>- <b>A 6 semaines post-greffe, les BMSC ont survécu et migré au sein des défauts parodontaux et se sont différenciés en ostéoblastes et fibroblastes suggérant leur potentiel à régénérer les tissus parodontaux.</b></li> </ul>
<p><b>Yang et al. (2010)</b> (85)</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- <u>Marquage GFP</u></li> <li>- Etude de la distribution de la GFP par autofluorescence.</li> <li>- Identification de <u>l'os alvéolaire néoformé</u> : par immunodétection de l'ostéocalcine (OC).</li> <li>- Identification du <u>ligament parodontal néoformé</u> : par coloration au Picosirius red pour révéler les fibres collagéniques recouvrant la surface radiculaire dénudée et leur orientation.</li> <li>- Identification du <u>cément néoformé</u> : en repérant le dépôt de matrice amorphe sur la surface radiculaire séparant le néocément de la dentine.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- A 3 semaines post-greffe : détection d'ostéoblastes (en surface de l'os néoformé) et d'ostéocytes (piégés au sein du nouvel os) GFP+ dérivant des BMSC greffées. Cependant, parmi les cellules GFP+, toutes ne sont pas OC+, seulement une partie des BMSC greffées se sont différenciées selon la lignée ostéogénique.</li> <li>- A cause du manque de marqueurs spécifiques du ciment, l'identification des cémentoblastes repose sur leurs caractéristiques morphologiques et leur position en relation avec le ciment néoformé. Présence de cellules GFP+ semblant correspondre aux cémentoblastes / cémentocytes.</li> <li>- Pas de marqueurs spécifiques du ligament parodontal. Cependant, des cellules GFP+ apparentées à des fibroblastes se trouvent intercalées entre les fibres de collagènes et sont aisément détectables dans les coupes.</li> <li>- <b>A 3 semaines post-greffe : colocalisation de la GFP et de l'ostéocalcine démontrant qu'un ensemble d'ostéoblastes / ostéocytes dans l'os néoformé provient directement des BMSC greffées. Cependant, toutes les cellules ostéogéniques n'étaient pas GFP+. Les cellules progénitrices de l'hôte pourraient avoir été recrutées par les BMSC via la sécrétion de facteurs trophiques. Présence de cellules apparentées aux cémentoblastes / cémentocytes GFP+ indiquant que les BMSC peuvent se différencier en lignée cémentogénique, bien que le manque de marqueurs tissulaires spécifiques empêche une conclusion définitive. Il n'est pas possible de déterminer si les nouvelles fibres du ligament parodontal ont été formées seulement à partir des BMSC greffées ou générées en partie par les cellules progénitrices endogènes. Cependant, la localisation des fibroblastes GFP+ à côté de ces fibres témoigne du rôle crucial des BMSC transplantées dans la régénération et l'organisation fonctionnelle du ligament parodontal.</b></li> </ul>

<p><b>Yu et al. (2013) (86)</b></p>	<p>- <u>Marquage eGFP</u> - Analyses histologiques : colorations à l'hématoxyline-éosine (HE) et au Picrosirius red.</p>	<p>- A 8 semaines post-greffe : eGFP détectée dans les cellules apparentées aux cémentoblastes (en surface du ciment néoformé), aux fibroblastes (au sein du ligament parodontal) et aux ostéoblastes (présents à la surface de l'os néoformé). Les GMSC greffées sont ainsi capables de se différencier et participent directement à la reconstruction des tissus parodontaux. Cependant, tous les cémentoblastes, ostéoblastes et fibroblastes n'expriment pas l'eGFP. La régénération des tissus parodontaux fait ainsi intervenir à la fois les cellules greffées et les cellules souches endogènes.</p> <p>- <b>A 8 semaines post-greffe : les GMSC greffées ont favorisé la régénération parodontale de manière <u>directe</u> par différenciation cellulaire, et de manière <u>indirecte</u> par stimulation des cellules progénitrices endogènes.</b></p>
<p><b>Lemaitre et al. (2016) (69)</b></p>	<p>- <u>Caractéristiques de l'étude</u> : Modèle <u>souris</u> de parodontite induite par gavage oral de bactéries pathogènes parodontales. Défauts parodontaux greffés avec des ASC syngéniques exprimant la GFP au sein d'un vecteur collagénique. Période d'observation : 12 semaines.</p> <p>- <u>Marquage GFP</u> - Analyses histologiques et histomorphométriques : coloration au trichrome de Masson (MT). - Analyses <u>immunohistochimiques</u> : Etude de la distribution de marqueurs des tissus minéralisés (BMP-2 / OPN), d'un marqueur endothélial (CD31) et de marqueurs de surface des progéniteurs du tissu conjonctif (CD146 / SCA-1). - Expériences réalisées à différents temps : 0 / 1 / 6 / 12 semaines.</p>	<p>- De 1 à 6 semaines post-greffe : cellules GFP+ retrouvées au sein du défaut parodontal, notamment autour des vaisseaux sanguins du ligament parodontal et de l'os alvéolaire.</p> <p>- A 12 semaines post-greffe, cellules GFP+ presque indétectables sur les sites transplantés. Dépôt important de ciment, meilleure organisation des fibres parodontales avec présence de fibres de Sharpey denses et homogènes et augmentation significative de la vascularisation dans le ligament parodontal par rapport au contrôle. Expression de BMP-2 et OPN augmentées par comparaison au contrôle (fort dépôt d'OPN retrouvé au niveau des interfaces ligament parodontal / ciment et ligament parodontal / os alvéolaire).</p> <p>- <u>SCA-1 et CD146</u> : Leur expression parmi la population cellulaire du ligament parodontal a été clairement modifiée suite à la greffe d'ASC de 1 à 12 semaines par rapport au contrôle. A 1 semaine post-greffe, des populations cellulaires <u>SCA-1- / CD146+</u> et <u>SCA-1+ / CD146-</u> ont été observées au sein du ligament parodontal (côté os alvéolaire), et très peu retrouvées dans le contrôle. A 6 semaines post-greffe, les sites expérimentaux comprennent des cellules ligamentaires SCA-1- reflétant la couche cémentoblastique, tandis que les cellules SCA-1+ restent localisées autour des vaisseaux du ligament parodontal. Une population transitoire périvasculaire <u>SCA-1+ / CD146+</u> a émergé à ce stade et est complètement absente pour le contrôle. A 12 semaines post-greffe, l'expression de SCA-1 a presque entièrement disparue dans le ligament parodontal. La population cellulaire SCA-1- / CD146+ reste présente à l'interface ligament parodontal / os alvéolaire au sein des sites greffés seulement.</p> <p>- <b>La disparition progressive des cellules greffées parallèlement à l'augmentation des marqueurs des précurseurs ostéo-cémentogéniques CD146 et SCA-1 au sein du ligament parodontal suggère que les cellules greffées ne semblent pas se différencier en phénotypes cibles spécifiques, mais induisent plutôt un microenvironnement favorable au recrutement et à l'engagement des progéniteurs endogènes (effets paracrines et locaux). La population cellulaire périvasculaire SCA-1+ peut être apparentée aux précurseurs parodontaux précoces, tandis que la sous population SCA-1- / CD146+ localisée sous la couche cémentoblastique pourrait correspondre à une population pré-différenciée évoluant vers la lignée cémentoblastique.</b></p> <p>- <b>12 semaines après la greffe d'ASC : amélioration significative du microenvironnement du ligament parodontal conduisant au rétablissement de l'homéostasie des tissus de soutien dentaires. Mise en évidence de la régénération du parodonte profond à la fois <u>quantitativement</u> et <u>qualitativement</u> par rapport au contrôle.</b></p>

Parmi les articles mentionnés (Tableau 1), le suivi des MSC transplantées a été effectué à partir des marqueurs GFP ou eGFP (pour six études), BrdU (pour deux études) et PKH26 (pour une étude). La présence de cellules marquées a pu être identifiée dans la majorité des études à la fin de la période d'observation, soit entre 3 et 12 semaines. Cependant, la plupart des études ne comprennent pas de données quantifiables, ni d'analyses à des temps intermédiaires, permettant d'évaluer l'évolution du nombre de cellules greffées au cours du temps. Seules les publications d'Iwasaki *et al.* (80) et de Lemaitre *et al.* (69) incluent des temps intermédiaires concluant à une baisse du nombre de cellules greffées au cours du temps, avec une disparition presque complète des cellules marquées à 4 semaines post-greffe pour Iwasaki *et al.*, et à 12 semaines post-greffe pour Lemaitre *et al.*, malgré la mise en évidence d'une amélioration significative de la régénération parodontale par rapport aux groupes contrôles. Concernant les capacités de différenciation des MSC greffées, des marqueurs spécifiques de la lignée ostéogénique ont pu être testés comme l'ostéocalcine et cbfa-1. D'autres marqueurs révélant les tissus minéralisés (BSP, OPN, BMP-2), ainsi que les fibroblastes et cellules endothéliales ( $\alpha$ -SMA), ont été mis en œuvre et confrontés à la morphologie et à la position des cellules observées afin de déterminer leur phénotype cellulaire. En effet, le manque de marqueurs spécifiques relatifs au ciment et au ligament parodontal ne permet pas de certifier avec exactitude le phénotype des cellules identifiées. Ainsi, d'après les études rapportées, les mécanismes par lesquels les MSC transplantées contribuent au processus de régénération parodontale restent à approfondir. Pour Hasegawa *et al.* (79), Liu *et al.* (81) et Wei *et al.* (84), un mécanisme direct de différenciation des cellules greffées serait à l'origine des tissus régénérés, tandis que pour Menicanin *et al.* (82), Yang *et al.* (85), et Yu *et al.* (86), les cellules transplantées agiraient à la fois de manière directe (par différenciation) et indirecte (via la stimulation des progéniteurs endogènes). Quant aux études d'Iwasaki *et al.* (80) et de Lemaitre *et al.* (69), elles privilégient un effet indirect des MSC greffées sur la régénération parodontale via le recrutement et l'engagement des progéniteurs endogènes. Tandis qu'Iwasaki *et al.* (80) concluent à cet effet indirect par défaut de cellules marquées, Lemaitre *et al.* (69) mettent en évidence, par une approche originale, la modification de l'expression de marqueurs de surface (CD146 et SCA-1) au sein de précurseurs endogènes du ligament parodontal, témoignant de leur probable activation, suite à la greffe d'ASC par rapport au groupe contrôle. Ces deux dernières études penchent ainsi en faveur du consensus actuel stipulant que même si des événements de transdifférenciation des MSC peuvent se produire, celles-ci agissent plus probablement en favorisant le potentiel de différenciation des progéniteurs endogènes.

### **C. Besoin de modèles d'étude 3D innovants *in vitro/ex vivo***

Bien que ces études apportent des informations intéressantes sur le devenir et la participation des MSC transplantées au cours du processus de régénération parodontale, des recherches supplémentaires sont nécessaires afin de décrypter les mécanismes mis en jeu. Dans ce contexte, le recours aux modèles animaux précliniques se heurte à certaines contraintes. En effet, la récolte des échantillons, la préparation des coupes ainsi que leur analyse individuelle, constituent des étapes relativement longues, et l'exploration structurale tridimensionnelle des tissus s'avère très difficile. De plus, la réalisation d'analyses au cours du temps (à différents points intermédiaires) demeure limitée par le nombre d'échantillons inclus dans les études car les modèles animaux sont très coûteux et que leur utilisation est strictement encadrée par le principe des 3R (Réduire, Remplacer, Raffiner) constituant le fondement de la démarche éthique relative à l'expérimentation animale.

Ce constat souligne la nécessité de développer des modèles expérimentaux 3D *in vitro* et *ex vivo* pertinents, capables de retranscrire le plus fidèlement possible le contexte de greffe chez l'Homme afin de permettre le suivi des interactions cellulaires dans le cadre de l'ingénierie tissulaire. A ce titre, l'utilisation d'explants biologiques ou d'organoïdes, se développant et reconstituant la fonction d'un « mini organe » grâce à un lignage des cellules souches ou progénitrices spécifiques de l'organe en question, constituent une excellente alternative aux modèles animaux. D'autres modèles, mimant également la physiologie parodontale humaine, peuvent être mis en œuvre comme les cultures 3D telles que les sphéroïdes. Il s'agit d'agrégats multicellulaires (hétérogènes ou homogènes) s'auto-organisant à travers une sélection cellulaire. Ces derniers sont reconnus comme étant des modèles capables de reproduire *in vitro* la complexité des tissus, demeurant ainsi particulièrement prédictifs de la réponse *in vivo*. Ils sont aujourd'hui largement utilisés dans l'évaluation préclinique de traitements en développement.

#### **D. Méthodes d'exploration pour l'évaluation préclinique des modèles d'étude 3D**

Les modèles 3D *in vitro* sont particulièrement adaptés à l'exploration de l'organisation des tissus et des organes en 3D par des approches de microscopie 3D telle que la microscopie confocale, par exemple. Avec ce type de microscopie, basée sur l'utilisation d'un balayage laser, le signal est récupéré à travers un diaphragme (pinhole) qui contre sélectionne tout signal ne provenant pas du plan focal. L'image est construite point par point par balayage (X,Y) du champ analysé à l'aide de miroirs de déflexion de la source lumineuse. La microscopie bi-photonique, quant à elle, repose sur le principe d'excitation du fluorophore par plusieurs photons quasi-simultanément, en utilisant de grandes longueurs d'ondes (lasers infra-rouges pulsés extrêmement puissants) assurant une plus grande pénétration à l'intérieur de l'échantillon que la microscopie confocale (jusqu'à 500  $\mu\text{m}$  au lieu de 150  $\mu\text{m}$ ), offrant ainsi la possibilité de travailler sur des échantillons plus épais. De plus, l'excitation des fluorophores étant limitée au point de focalisation du faisceau laser, et non pas à ce qu'il y a autour de ce plan, le risque de photoblanchiment est réduit. Ces deux types de microscopie offrent une approche efficace pour imager la structure 3D basée sur la fluorescence et partagent également des limites quasi-similaires en termes de profondeur de pénétration en raison de la diffusion de la lumière. En revanche, la microscopie à feuille de lumière (SPIM - Selective Plane Illumination Microscope) présente certains avantages par rapport aux techniques de microscopie précédentes, telles que la rapidité d'acquisition et la réduction de la photo-toxicité ainsi que du photo-blanchiment. Le principe de ce type de microscopie consiste à illuminer une seule coupe optique de l'échantillon avec un faisceau de lumière sous forme de feuille. La fluorescence émise de la coupe optique de l'échantillon est récupérée à 90° via un objectif de détection relié à une caméra CCD (87). Cette configuration d'imagerie limite le photo-blanchiment en minimisant la quantité d'énergie d'excitation que reçoit l'échantillon, contrairement à la microscopie confocale où la totalité de l'échantillon est excitée. Cette conception rend également l'acquisition de données, à différentes profondeurs, extrêmement rapide et efficace par rapport aux microscopes confocaux et autres microscopes à balayage, une rapidité souvent indispensable aux applications exigeant une certaine fréquence d'imagerie. Cependant, la pénétration de la feuille de lumière est également limitée par la diffusion à l'intérieur de l'échantillon biologique. De nombreuses techniques de traitement de transparence, aqueuses ou organiques, ont été développées pour rendre les tissus transparents telles que la méthode de Murray (Annexe 5), basée sur l'utilisation de Benzyl Alcool et Benzyl Benzoate (BABB) (88), qui consiste à homogénéiser les indices de réfraction d'un tissu en remplaçant les composants à faible indice de réfraction, telle que l'eau, par un solvant possédant un indice de

réfraction plus proche de celui des protéines et des lipides. Ainsi, la diffusion de la lumière est fortement réduite et l'analyse en profondeur est favorisée. Ces stratégies de transparence, combinées à la microscopie à feuille de lumière, permettent l'exploration en profondeur de modèles 3D épais et complexes, mais aussi de tissus ou d'organes entiers du petit animal.

## 6. Le projet ANR ASC-PARO

### A. Objectif de l'étude

Le projet ASC-PARO a été mis en place pour étudier l'efficacité et l'innocuité d'une thérapie cellulaire régénérative innovante de la parodontite par des ASC. En parallèle et en complément d'études sur des modèles animaux comme le Beagle ou la souris, un volet de ce projet est consacré aux études *in vitro* et fait ainsi l'objet de la thèse. Cette partie du projet est dédiée à explorer, *in vitro* et *ex vivo*, les mécanismes d'action des ASC soutenant leurs propriétés antibactériennes, immunomodulatrices et pro-différenciantes sur la régénération tissulaire parodontale. En vue d'une application en parodontologie, des études antérieures, *in vitro*, du projet ASC-PARO ont permis d'optimiser un biomatériau en tant que vecteur des ASC pour implantation dans un environnement parodontal : le concentré de lysat plaquettaire. Cet hydrogel de lysat plaquettaire (hLP) mime une matrice extracellulaire tridimensionnelle (89). Par ses propriétés microporeuses, favorables à la migration, à la prolifération, à l'adhésion et à la différenciation cellulaire, ce biomatériau est non seulement biodégradable mais aussi facilement manipulable. Ce support cellulaire est obtenu à partir d'un mélange de lysat plaquettaire (issu de prélèvements sanguins allogéniques) et de concentrations optimales de  $\text{CaCl}_2$ , de NaCl et d'acide tranexamique (AT) (90) qui induisent sa polymérisation. Le mélange de hLP et de cellules stromales mésenchymateuses telles que les ASC est alors défini comme un biohybride (91).

L'objectif général de cette partie du projet est d'étudier les interactions entre les ASC greffées et les cellules parodontales endogènes impliquées dans la régénération des tissus de soutien de la dent, par l'imagerie 3D/modèles 3D pour comprendre les mécanismes à l'origine de la régénération du parodonte profond. Pour cela, le but est de modéliser *ex vivo* la situation de greffe en employant deux modèles basés sur l'utilisation d'un biomatériau en tant que véhicule des ASC greffées.

### B. Présentation des modèles 3D expérimentaux et déroulement de l'étude

- ✚ Le premier modèle consiste à mettre au point des sphéroïdes parodontaux qui seront mis en contact avec des ASC au sein du biomatériau (biohybride). Deux types de sphéroïdes sont étudiés en parallèle : des sphéroïdes constitués à partir de la fraction stromale vasculaire (SVF) parodontale et des sphéroïdes constitués à partir de MSC gingivales.
- ✚ Le deuxième modèle consiste à déposer le biohybride contenant des ASC entre un prélèvement gingival et une tranche fine de dentine, de façon à reconstituer un modèle de greffe « gencive-like » dans son environnement biologique. La dentine joue ainsi le rôle d'un support « dur » mimant le support osseux chez l'Homme. De plus, sa structure « poreuse » due à la présence de tubulis dentinaires permet d'assurer la perfusion du greffon gingival par capillarité.

Dans l'optique de simuler l'activité des ASC en greffe parodontale, une première partie a été consacrée à la mise au point de marquages pour un suivi différentiel des ASC (préparées à partir de tissus adipeux sous cutanés) et des MSC gingivales (issues d'un prélèvement de gencive) en co-culture en 2D en cinétique. Parallèlement, le biohybride d'ASC humaines, qui est à la base des deux modèles d'étude proposés, est caractérisé seul par de l'imagerie 3D. La dernière partie a été consacrée aux deux modèles afin d'étudier en parallèle la viabilité, la prolifération, la migration, et les interactions intercellulaires, évaluées par des approches histologiques et d'imagerie 3D, principalement à feuille de lumière.

## **II. Matériel et méthodes**

### **1. Culture cellulaire**

#### **A. Types cellulaires**

Deux types cellulaires sont utilisés : des cellules stromales mésenchymateuses gingivales (MSC-G) et des cellules stromales mésenchymateuses du tissu adipeux sous cutané (ASC). Les tissus à l'origine de ces cellules sont prélevés dans le cadre de procédures chirurgicales programmées au CHU de Rangueil (Toulouse) après non-opposition des donneurs.

#### **B. Digestion de tissus humains**

Les cellules sont récupérées par digestion des tissus à la collagénase de type NB4 (*Serva ref. 17454*) – 13.6 U au bain marie à 37°C en agitation pendant 40 à 45min. La réaction de digestion est inhibée par l'ajout de milieu de culture  $\alpha$ -Minimum Essential Medium ( $\alpha$ MEM - *Life Technologies*) supplémenté en 2% de lysat plaquettaire (LP) défibriné (*Cook Regentec*) et 1% d'Amphotéricine B-Streptomycine-Pénicilline (ASP - *Sigma-Aldrich*). Le mélange cellulaire hétérogène obtenu est appelé fraction stromale vasculaire (SVF) et est ensuite centrifugé 5 min à 600g. Les cellules érythrocytaires sont lysées par un tampon de lyse (Composé de NaCl,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , EDTA et  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ). Les cellules sont mises en culture puis rincées après quelques heures pour sélectionner par adhésion les MSC-G ou ASC cultivées. Le milieu de culture est renouvelé tous les 2 jours pendant une semaine.

#### **C. Culture cellulaire**

Les MSC-G et les ASC sont cultivées en milieu de culture  $\alpha$ MEM complet, à 37°C avec 5 % de  $\text{CO}_2$ , en flasques T75 ou en plaques 6 puits, après ensemencement à raison de 4000 cellules par  $\text{cm}^2$ . Les cellules ont été utilisées du passage 1 à 3.

#### **D. Marquage cellulaire**

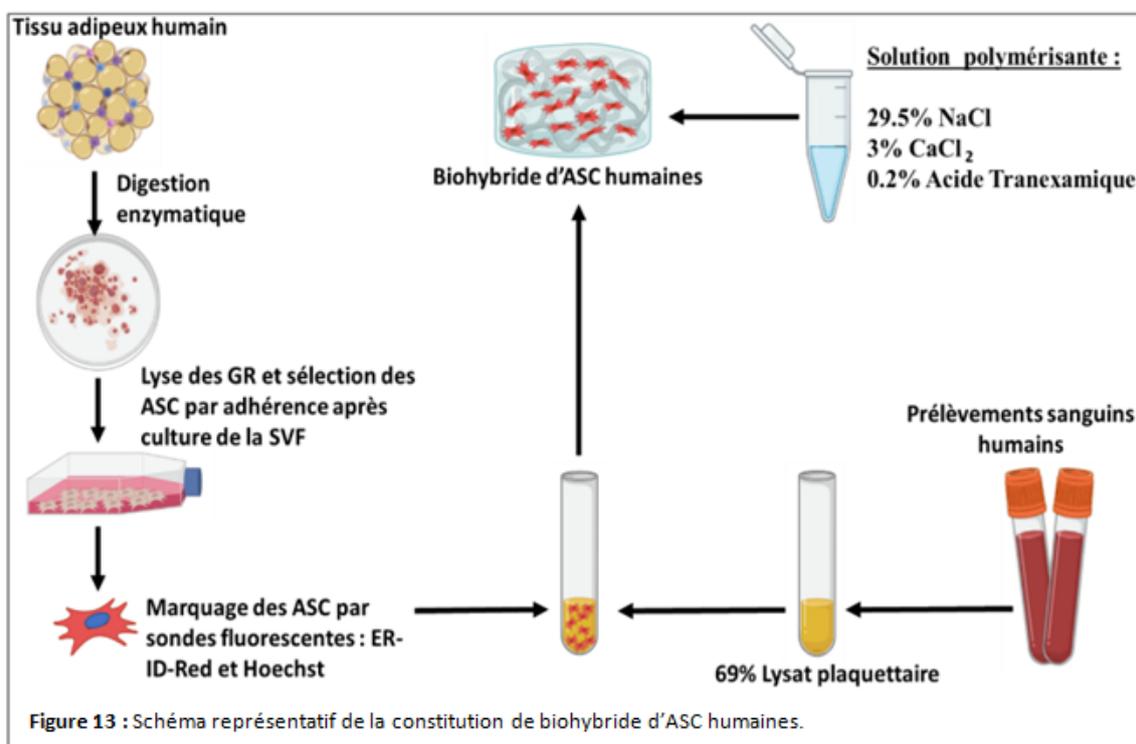
Les ASC et les MSC-G sont ensemencées seules en plaque 96 puits à 4000 cellules par  $\text{cm}^2$ , et marquées en adhérence selon les recommandations du fabricant par une solution d'ER-ID Red (*ENZO-51026-K500*) dilué au  $1/500^{\text{ème}}$  ou de NuclID Red (*ENZO-51008-K100*) dilué au  $1/250^{\text{ème}}$  ou de NuclID Green (*ENZ-51014-100*) dilué au  $1/1000^{\text{ème}}$  ou de CytoID Red (*ENZO-51037-K025*) dilué au  $1/500^{\text{ème}}$  ou de CytoID Green (*ENZO-51036-K025*) dilué au  $1/500^{\text{ème}}$  ou de CMTMR Orange (*ThermoFisher-C2927*) dilué au  $1/100^{\text{ème}}$  ou de Cell mask deep Red (*ThermoFisher-C10046*) dilué au

1/1000<sup>ème</sup> ou de Cell tracker Green-CMFD (ThermoFisher-C2925) dilué au 1/1000<sup>ème</sup> ou de CFSE (ThermoFisher-C34554) dilué au 1/1000<sup>ème</sup> ou de CFDA-SE (ThermoFisher-C1157) dilué au 1/3000<sup>ème</sup>.

## 2. Modèles expérimentaux

### A. Culture d'ASC en hydrogel

Les ASC, préalablement marquées en suspension par le ER-ID Red et/ou Hoechst (ENZO33352), sont reprises dans du LP non défibriné. Cette préparation est mélangée à la solution d'éléments polymérisant de l'hydrogel et répartie dans les puits d'une plaque 48 puits à raison de 50 000 ASC/300 µL/puits (Figure 13). Après 45 min de polymérisation à 37°C, 400 µL de milieu de culture αMEM complet sont ajoutés au gel. Ce milieu de culture est renouvelé tous les jours.



### B. Constitution de sphéroïdes de SVF parodontale

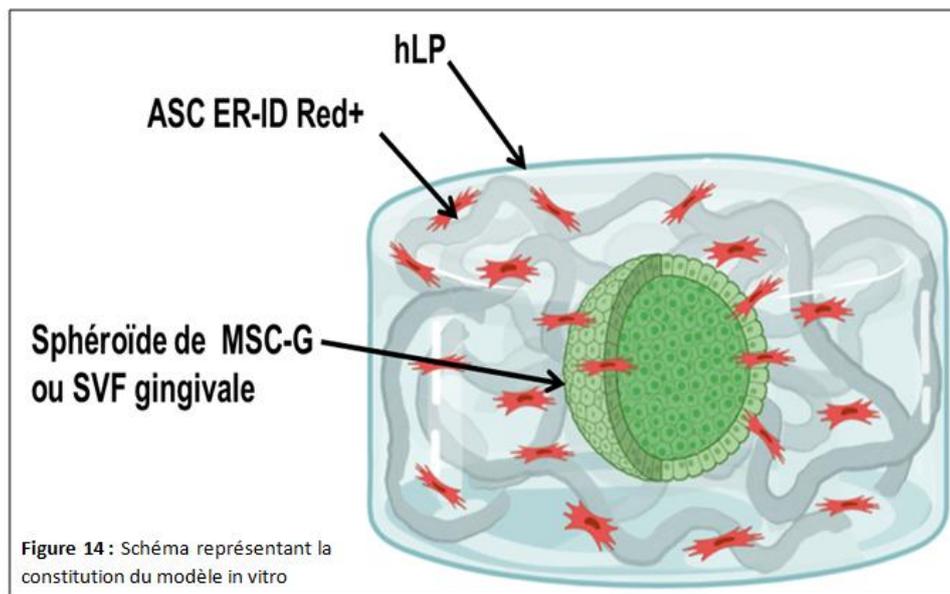
Après digestion du tissu gingival par la collagénase NB4, le mélange cellulaire hétérogène obtenu est appelé fraction stromale vasculaire (SVF). La suspension cellulaire obtenue est ajustée avec du milieu de culture αMEM complet ou de l'Endothelial Growth Medium 2 (EGM2 - Life Technologies) supplémenté en 1% de Pénicilline-Streptomycine (SP-Sigma-Aldrich) à la bonne concentration cellulaire (0,5M/mL pour des sphéroïdes de 50 000 cellules). Ce dernier milieu étant censé favoriser la prolifération des cellules en les maintenant dans un état plus immature. La suspension cellulaire est ensuiteensemencée en plaque 96 puits ULA (Costar Ultra Low Attachement) à raison de 50 000 cellules dans 100µL par puits, et centrifugée 2 min à 200g dans un sens puis 2min à 200g dans l'autre sens. La plaque est placée à 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. Le milieu de culture cellulaire est renouvelé tous les 2-3 jours.

### C. Constitution de sphéroïdes de MSG gingivales

La suspension cellulaire de MSC-G est ajustée avec du milieu de culture  $\alpha$ MEM complet à une concentration cellulaire de 0,5 million de cellules/mL pour constituer des sphéroïdes de 50 000 cellules. Ces cellules sont ensuiteensemencées en plaque 96 puits ULA à 50 000 cellules dans 100 $\mu$ L par puits, et centrifugées 2 min à 200g dans un sens puis 2min à 200g dans l'autre sens. La plaque est placée à 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. Le milieu est renouvelé tous les 2-3 jours.

### D. Sphéroïdes parodontaux au sein du biohybride d'ASC

Des sphéroïdes parodontaux sont mis en contact avec des ASC au sein du biomatériau (Figure 14).

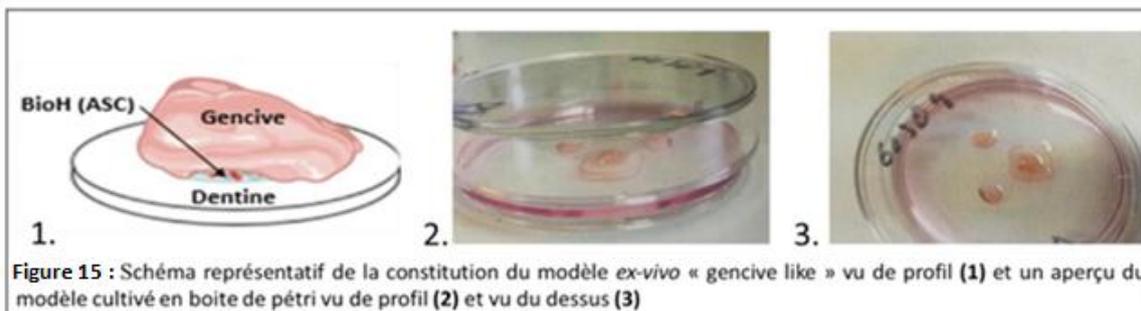


### E. Culture d'explant de gencive sur tranche de dentine

Un explant gingival (d'environ 2 mm<sup>2</sup>) est déposé sur une tranche de dentine humaine de 500  $\mu$ m d'épaisseur en boîte de pétri. Ce montage est cultivé 72h en milieu de culture  $\alpha$ MEM complet afin que le prélèvement adhère à la dentine et mime ainsi la situation clinique.

### F. Greffe de biohybride d'ASC entre explant de gencive et tranche de dentine

Un biohybride, contenant des ASC marquées au préalable avec le marqueur ER-ID et/ou Hoechst, est greffé entre la face conjonctive de l'explant de gencive et la tranche de dentine cultivés préalablement pendant 72h (Figure 15). Le milieu de culture  $\alpha$ MEM complet est renouvelé tous les jours. A chaque temps de l'étude, l'ensemble est prélevé, lavé 2 fois en PBS (*Gibco*) et fixé 10 min en PFA 4% avant d'être rincé 2 fois en PBS.



### 3. Imagerie

#### A. Microscope binoculaire

**Objectif :** Evaluer la morphologie et l'organisation de sphéroïdes formés à partir de SVF parodontale ou de MSC gingivales dans le but d'acquérir une organisation cellulaire tridimensionnelle physiologique.

L'observation des sphéroïdes se fait en plaques 96 puits ULA à l'objectif 10X ou 40X en lumière transmise au microscope binoculaire (*Zeiss Technology*).

#### B. Acquisition en temps réel de cultures cellulaires en 2D au videomicroscope

**Objectif :** Identifier des marqueurs cellulaires fiables pour le suivi des ASC et des MSC-G afin de mettre en évidence des interactions et des échanges potentiels de matériel cellulaire entre ces deux types de cellules.

Une monocouche cellulaire d'ASC ou de MSC-G,ensemencées préalablement, est marquée en adhérence par une solution de marqueurs selon les recommandations du fabricant sur plaque 96 puits noire à fond plat (*Corning® CellBIND®Surface*). Ces cellules sont ensuite cultivées dans un milieu OptiMEM (Life Technologies) supplémenté en 2% de LP défibriné et 1% de Pénicilline-Streptomycine (SP-Sigma-Aldrich) pendant 72h, dans la chambre thermostatée à 37°C du videomicroscope où le CO<sub>2</sub> est maintenu à 5%. L'observation se fait au microscope à champs large (*Zeiss Technology*) à l'objectif 10X piloté par le logiciel *ZenPRO*. Le canal d'acquisition DsRed, avec un temps d'exposition de 100 ms, est utilisé pour exciter le NuclID Red, CytoID Red et ER-ID Red. Le FITC, avec un temps d'exposition de 100ms, est utilisé pour exciter le NuclID Green, CytoID Green, CMFDA, CFDA-SE et le CFSE. Le Cy3, avec un temps d'exposition de 250ms, est utilisé pour exciter le CMTMR Orange.

#### C. Microscopie à feuille de lumière : (Annexe 6)

**Objectif :** Suivre le comportement et la migration des ASC marquées au sein des modèles 3D expérimentaux, ainsi que leurs interactions avec les cellules progénitrices endogènes.

#### D. Traitement d'image : (Annexe 7)

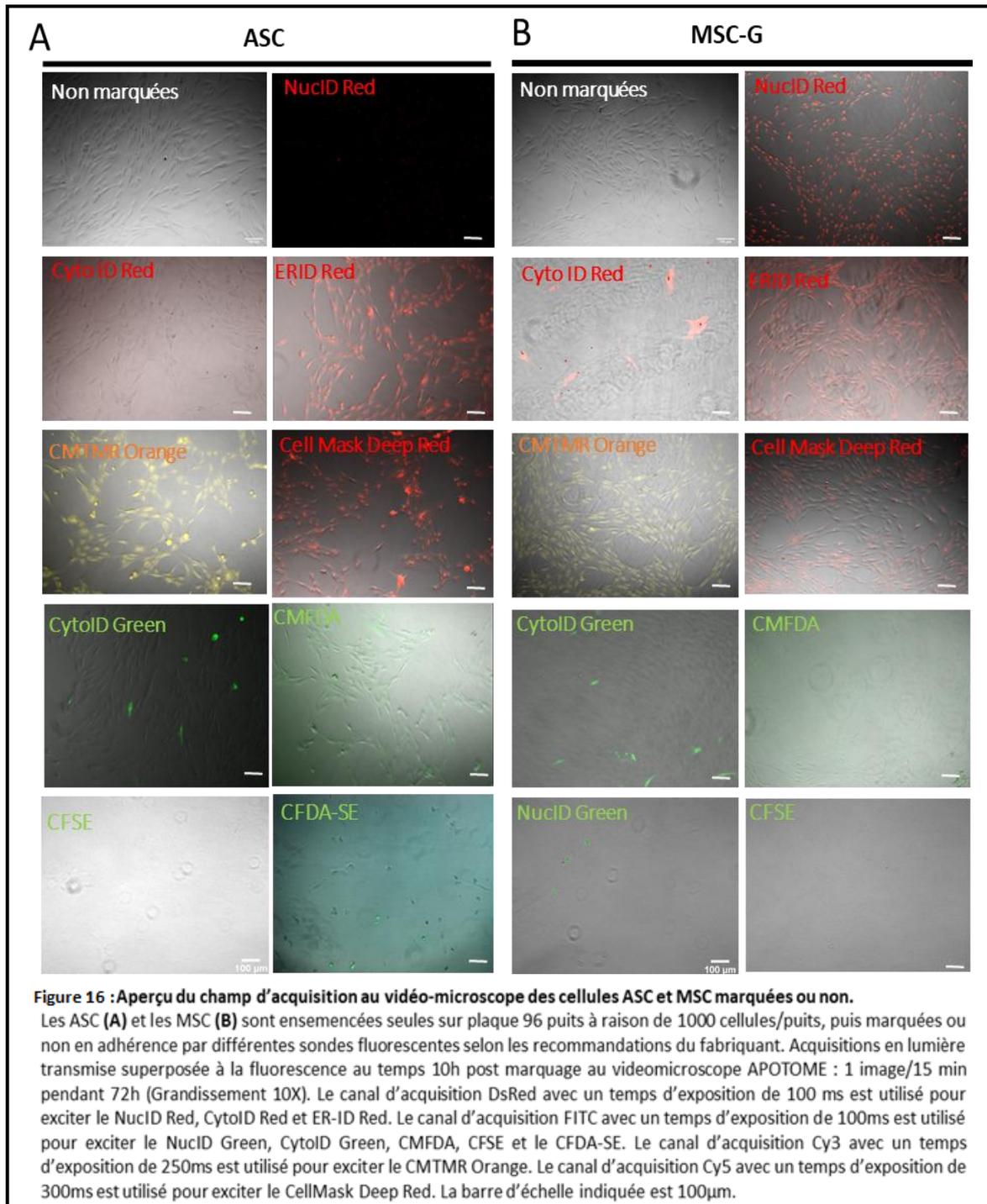
### III. Résultats

Les mécanismes impliqués dans la thérapie cellulaire par ASC soulèvent des questions sur le rôle de ces cellules dans les tissus greffés, en particulier par rapport à leurs homologues endogènes, les MSC gingivales. C'est pourquoi, afin d'étudier les relations entre ces cellules dans un contexte de greffe, il est primordial de mettre au point un protocole pour mimer la greffe d'ASC dans le tissu conjonctif gingival contenant des MSC spécifiques, et de suivre ces deux types cellulaires afin d'étudier leurs interactions. Dans le but de simuler l'activité des ASC en greffe parodontale, nous avons d'abord mis au point un marquage différentiel des ASC et MSC-G par des sondes fluorescentes en 2D en co-culture ce qui nous permettra, dans un premier temps, de mettre en évidence des interactions ou des échanges intercellulaires potentiels. Dans un second temps, grâce à la validation de ces marquages, il sera possible d'étudier l'interaction, au sein d'un hydrogel, des ASC avec un sphéroïde de MSC-G ou un sphéroïde constitué à partir de la fraction stromale vasculaire, afin de se rapprocher *in vitro* de l'organisation 3D de l'ensemble des cellules composant les tissus gingivaux. La détection spécifique des ASC sera également primordiale pour les suivre au sein d'un hydrogel greffé dans un modèle de culture gingivale sur tranche de dentine. La viabilité, la prolifération, la migration et l'organisation sont évaluées par une approche d'imagerie 3D, principalement à feuille de lumière.

#### 1. Optimisation de la détection différentielle des ASC et MSC-G en 2D

Nous avons commencé par mettre au point des sondes fluorescentes et des protocoles d'imagerie pour suivre le devenir des ASC en 2D pendant 72 heures par vidéomicroscopie. Le but étant de visualiser leurs interactions et l'échange potentiel de matériel intracellulaire avec les MSC-G (Figure 16) d'une part, et d'autre part de sélectionner des marqueurs fiables pour suivre les deux types cellulaires dans les expériences de greffe. Dans cette optique, des marqueurs fluorescents perméants (cytoplasmiques, nucléaires, marquant des organites), ayant des longueurs d'onde d'excitation et d'émission spécifiques et connues, sont utilisés.

Parmi les dix sondes testées sur les deux types cellulaires, les cytoID Red et Green marquent partiellement les deux types cellulaires et se diluent avec la mitose (Figure 16). Le NuclID Green, le CFSE et le CFDA-SE induisent la mort des MSC-G, tandis que le CFSE est létal pour les ASC à partir de 17h post-marquage. Le CMFDA marque faiblement les deux types cellulaires, laissant apparaître un bruit de fond important et gênant pour l'imagerie.



Le NuclID Red marque uniformément les MSC-G mais faiblement les ASC. Le contraire est observé par le marquage Cell Mask Deep Red. L'ER-ID Red et le CMTMR Orange, quant à eux, permettent un marquage uniforme des cellules, sans dilution au cours de la mitose. L'ER-ID Red a été sélectionné comme marqueur fiable pour le suivi des ASC ; il permet le marquage du réticulum endoplasmique de la totalité des cellules avec une intensité maintenue constante sur 72h d'acquisition au videomicroscope, sans cytotoxicité. Il s'avère que les MSC-G sont plus difficiles à marquer, en effet, plusieurs sondes émettant dans le vert ont été testées, et sont souvent cytotoxiques pour les MSC-G.

Un des objectifs étant de visualiser l'interaction potentielle entre les ASC marquées et le sphéroïde de MSC-G au sein d'un hydrogel de lysat plaquettaire (matériau porteur), la fluorescence du sphéroïde pourrait optiquement gêner la détection de la fluorescence d'une seule ASC qui interagit avec le sphéroïde, et cela d'autant plus si l'échantillon est non transpiré. Si les sphéroïdes de MSC-G ne sont pas marqués, il sera possible de détecter les ASC marquées. De plus, nous pourrions utiliser l'autofluorescence du sphéroïde pour détecter sa morphologie ainsi que l'éventuelle infiltration des ASC marquées au sein de celui-ci. Par conséquent, le marquage des MSC-G en 2D peut être abandonné. Cependant, afin de détecter l'échange potentiel de matériel intracellulaire entre les deux types cellulaires, une autre stratégie est développée. Cette stratégie consiste à suivre sur 72h ces deux types cellulaires en co-culture en ne marquant que les ASC par l'ER-ID Red. Le défi est de voir au cours du temps si elles entrent en contact, si celles qui sont marquées par l'ER-ID Red perdent du signal, et à l'inverse, si celles qui sont initialement non marquées démontrent un gain de fluorescence.

**L'ER-ID Red a pu être identifié comme un marqueur fiable pour le suivi des ASC au cours du temps, tandis que le marquage cellulaire des MSC-G s'est révélé plus complexe.**

## **2. Caractérisation de l'hydrogel de lysat plaquettaire contenant des ASC humaines en cinétique par imagerie 3D**

L'objectif est de caractériser des ASC marquées seules en hLP, et ainsi de mettre au point les conditions optimales afin d'évaluer l'interaction entre ces ASC au sein de l'hLP et le sphéroïde de MSC-G ou l'explant gingival, dans la suite des expériences. Dans cette optique, nous cherchons à mettre en évidence une variation du nombre, de la forme et de la taille des cellules sur une cinétique de 72h.

Pour cela, des hLP de 300 $\mu$ L sont constitués sans ASC ou avec 50 000 ASC marquées par l'ER-ID Red et/ou Hoechst, un marqueur nucléaire de viabilité. Le nombre de cellules choisi est estimé par rapport à des études antérieures. A deux temps d'étude l'hLP est prélevé, fixé, et imagé au SPIM (Figure 17A) et au MacroSPIM (Figure 18) à trois positions aléatoires. Par ailleurs, il manque un contrôle négatif (hydrogel avec ASC non marquées) qui n'a pas été fait par manque de cellules. Le SPIM est équipé de deux combinaisons de laser - filtre : 488nm - 510/20, avec lequel aucun signal de fluorescence n'a été détecté pour chacune des conditions, et 532nm - 593/LP, avec lequel nous observons de l'autofluorescence de l'hydrogel mais également la fluorescence du ER-ID. Dans toutes les conditions, l'intensité moyenne de fluorescence liée aux marquages cellulaires est généralement plus faible à t=72h qu'à t=0h (Figure 17B).

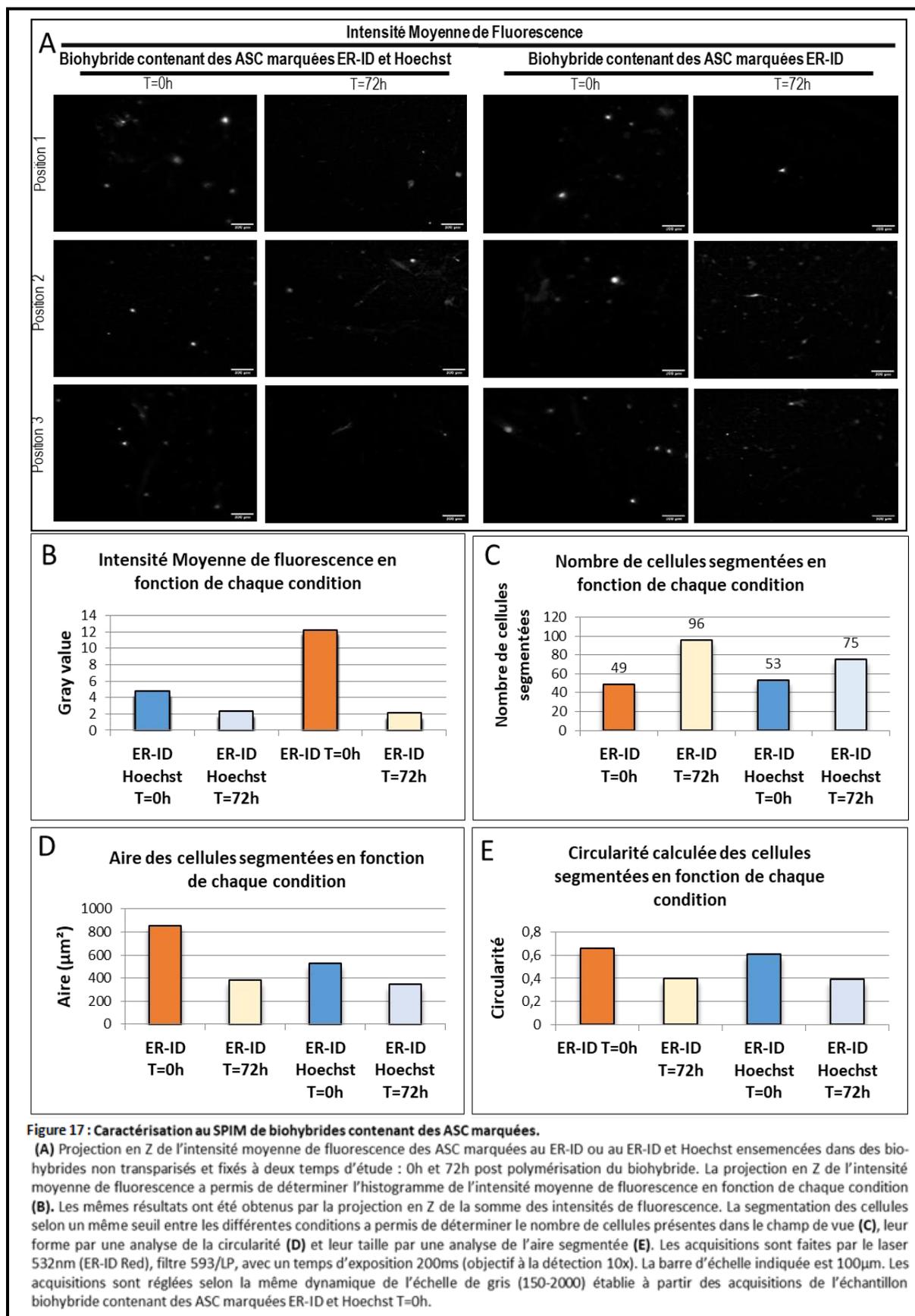
Il semble y avoir une compétition entre les marquages (ER-ID Red et Hoechst) même si ces deux sondes fluorescentes ciblent deux compartiments cellulaires distincts, via des mécanismes différents. La fluorescence du ER-ID détectée à t=72h post-polymérisation est plus faible qu'à t=0h post-polymérisation. Ce résultat pourrait provenir d'une dilution du marquage en fonction de la prolifération cellulaire, bien que celle-ci ne soit pas observée en culture 2D des ASC (Figure 16A). Une segmentation des projections en Z de l'intensité moyenne de fluorescence des hydrogels, contenant des ASC marquées au ER-ID Red ou ER-ID Red et Hoechst, est effectuée en vue de déterminer le nombre, la taille et la forme des cellules, entre les deux temps d'étude. Les réglages du seuil de segmentation des régions d'intérêt ont été effectués sur l'acquisition de l'échantillon hydrogel

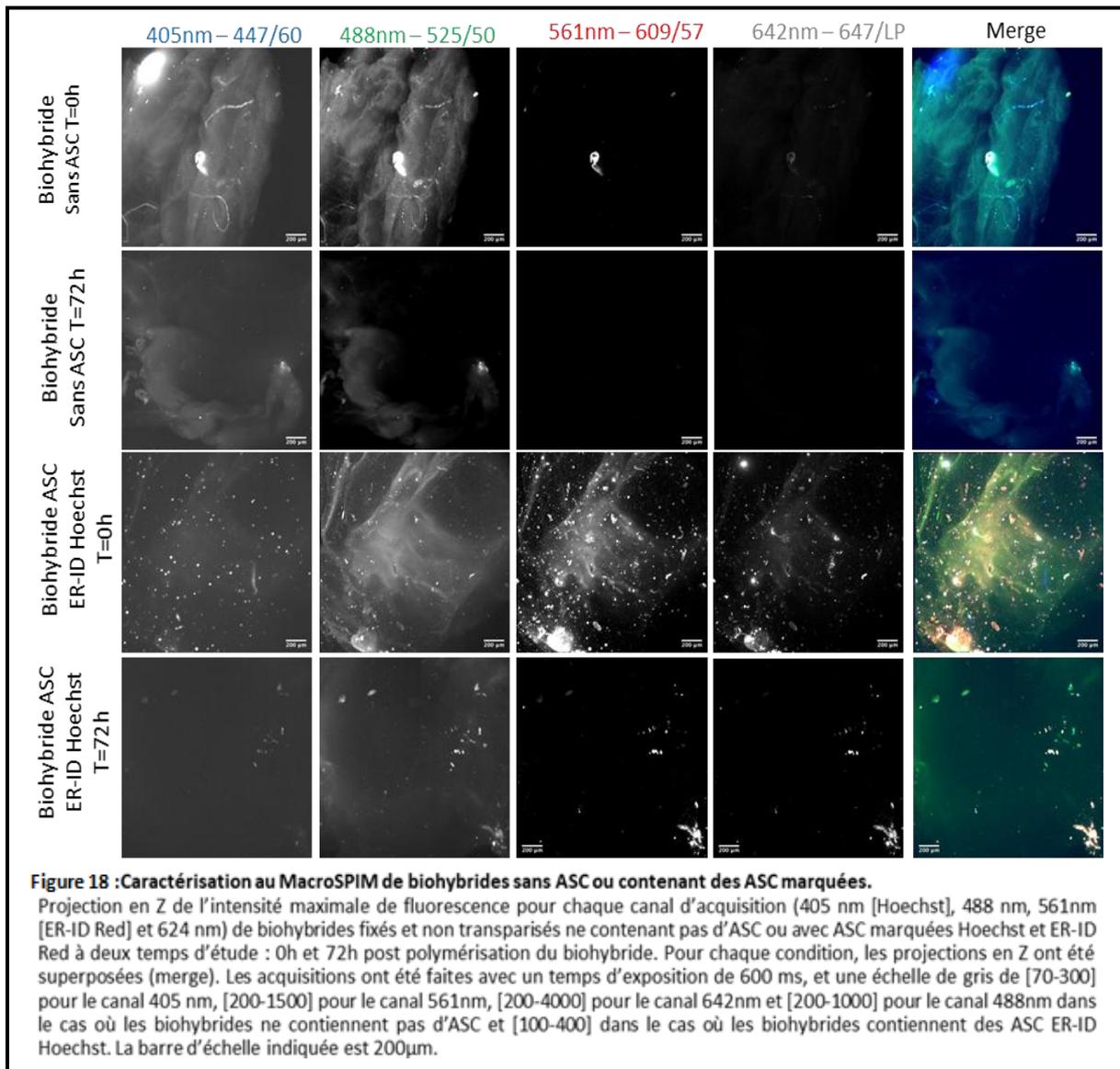
contenant des ASC marquées ER-ID Red et Hoechst, fixé à t=0h. Le nombre des ASC a augmenté dans les deux conditions de marquage entre t=0h et t=72h (Figure 17C).

Théoriquement, à t=0h, les cellules devraient être de forme plutôt sphérique et de petite taille, contrairement à t=72h où elles devraient être plus étalées et plus grandes. Dans les analyses des segmentations, une diminution de la circularité est notée avec le temps, dans toutes les conditions, et est représentative d'un étalement des cellules dans l'hydrogel au cours du temps (Figure 17E). Cependant, les cellules sont plus petites à t=72h qu'à t=0h (Figure 17D). En effet, l'analyse est réalisée sur un marquage du réticulum endoplasmique, un organite généralement localisé autour du noyau, et ne permet donc pas de visualiser la totalité de la cellule. De plus, nous avons remarqué qu'il y avait moins de fluorescence à t=72h qu'à t=0h. Ainsi, moins de signal est détecté, ce qui permet d'expliquer une diminution de la taille des cellules à t=72h.

Le SPIM ne possédant pas le laser permettant de détecter le Hoechst, les échantillons sont aussi imagés au MacroSPIM avec différents lasers et filtres (Figure 18). Nous remarquons la présence d'un signal spécifique des ASC marquées ER-ID Red et Hoechst en 405nm (Hoechst), 561nm (ER-ID) et 642nm, à t=0h. Ce signal n'est pas présent dans les hydrogels sans ASC pour le même temps d'étude. Une augmentation de l'autofluorescence du biohybride en 488nm, en absence d'ASC, est également observée. Une différence du nombre de cellules entre les conditions t=0h et t=72h n'a pas pu être mise en évidence. En effet, à t=72h, nous n'observons plus de marquage Hoechst (405nm), et l'intensité de fluorescence de l'ER-ID (561nm) a diminué.

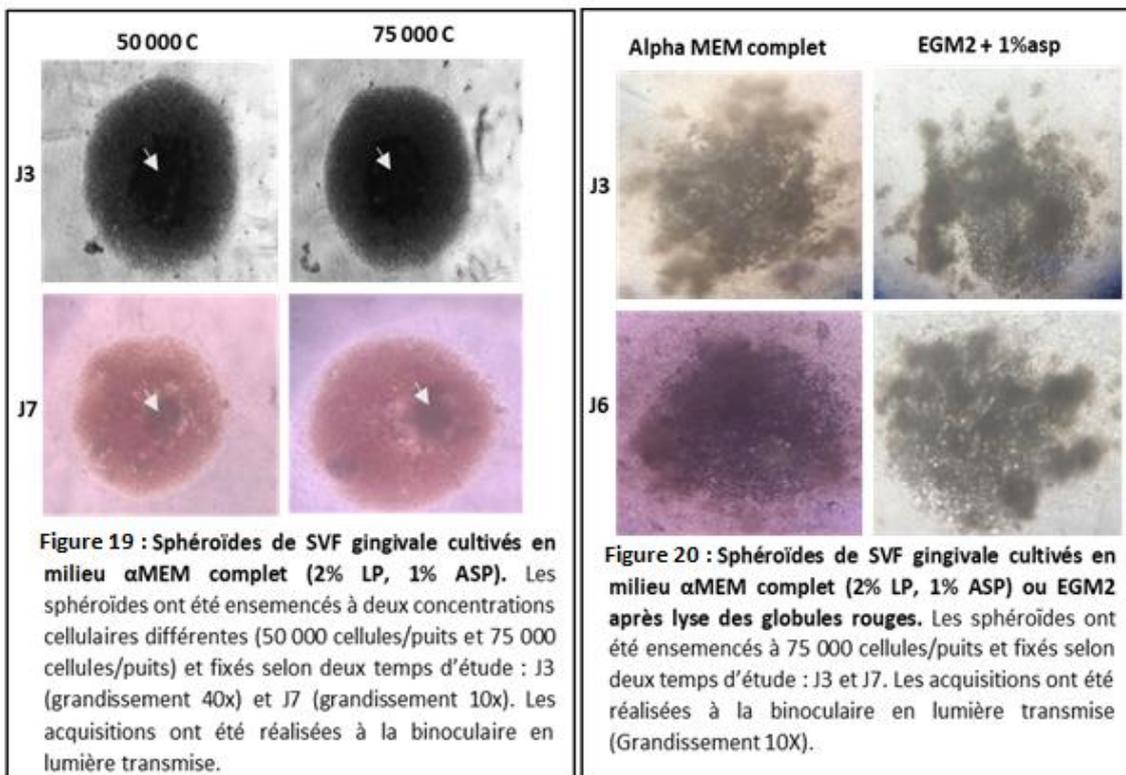
**L'analyse au SPIM a mis en évidence, au cours du temps, une diminution de la fluorescence des ASC marquées à l'ER-ID Red au sein de l'hLP, contrairement au nombre d'ASC présentes dans l'hydrogel qui, lui, a augmenté. L'aire et la circularité des ASC semblent avoir diminué avec le temps. D'autre part, le MacroSPIM a démontré un signal spécifique caractérisant les ASC marquées ER-ID Red et Hoechst au sein de l'hLP.**





### 3. Caractérisation de sphéroïdes de Fraction Stromale Vasculaire (SVF) parodontale sur une cinétique de 7 jours

Dans ce contexte, nous cherchons à reproduire *in vitro*, grâce à des organoïdes (sphéroïdes), l'organisation 3D de l'ensemble des cellules composant les tissus gingivaux et de caractériser ces sphéroïdes constitués à partir de la fraction stromale vasculaire parodontale sur une cinétique de 7 jours. L'objectif étant de réaliser de l'imagerie 3D ainsi que des études par détection d'immunofluorescence sur coupes afin d'étudier la prolifération, la viabilité, l'organisation et la différenciation des cellules. Pour cela, des sphéroïdes de 50 000 et 75 000 cellules ont été générés à partir de SVF de gencive, cultivés en milieu  $\alpha$ MEM complet puis fixés à J3 et J7. La concentration de 50 000 cellules par sphéroïde a été précédemment définie par le groupe de recherche, selon des études préliminaires, comme une concentration cellulaire optimale pour la formation de sphéroïdes de MSC-G. Cette concentration est appliquée aux sphéroïdes de SVF gingivale.

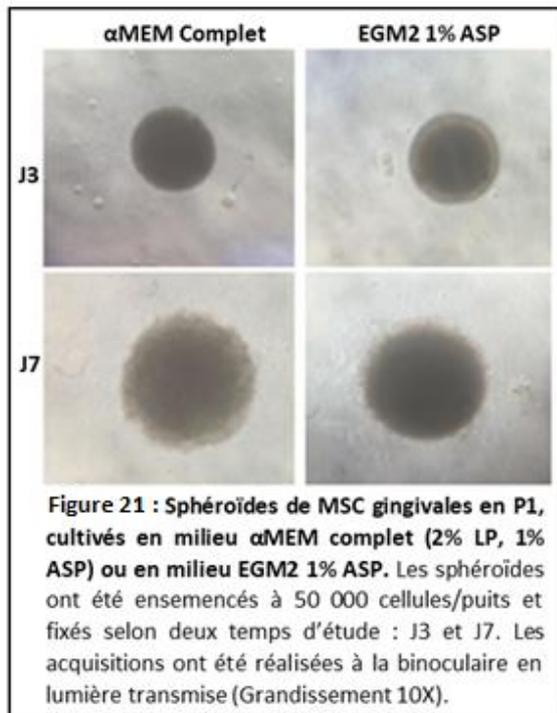


De plus, une deuxième concentration de 75 000 cellules est testée dans le but d'anticiper la perte de cellules n'ayant pas adhéré pendant la culture des sphéroïdes, telles que les globules rouges. A première vue, nous observons, dans toutes les conditions, un sphéroïde bien arrondi mais avec un centre dense (Figure 19 ; flèche) qui semble correspondre aux cellules du sphéroïde encerclé par des globules rouges (GR).

Pour valider cette hypothèse, une étape de lyse des GR a été incluse dans le protocole de constitution des sphéroïdes de SVF. De plus, pour optimiser la mise au point relative à la formation de ce type de sphéroïdes, un autre milieu de culture cellulaire a été testé : EGM2 1% ASP, censé favoriser la prolifération des cellules en les maintenant dans un état plus immature. Avec ce type de protocole, nous obtenons des sphéroïdes désorganisés et qui se désagrègent au cours de la manipulation (Figure 20). La lyse des globules rouges entraîne une désorganisation des sphéroïdes qui n'est sans doute pas bénéfique pour les autres cellules. Par ailleurs, le protocole de centrifugation, permettant l'agrégation des cellules dans le puits, ne semble pas être adapté à la formation de sphéroïdes de SVF gingivale.

**Le protocole de centrifugation utilisé ne s'est pas révélé favorable à la formation de sphéroïdes à partir de SVF parodontale. Il est préférable d'éviter la lyse des globules rouges qui a généré un stress important à l'ensemble des cellules, compromettant ainsi leur agrégation.**

#### 4. Caractérisation de sphéroïdes de MSC gingivales sur une cinétique de 7 jours



La finalité d'utiliser des sphéroïdes est d'acquérir une organisation cellulaire tridimensionnelle physiologique. Ce modèle de sphéroïde, correspondant à un modèle *in vitro* du parodonte, est une stratégie nous permettant d'étudier spécifiquement l'effet des ASC vis-à-vis des MSC-G. L'objectif de cette expérience est de caractériser des sphéroïdes de MSC-G pendant 7 jours.

Pour cela, des sphéroïdes constitués selon le protocole de centrifugation à partir de MSC-G en P1 sont ensemencés à raison de 50 000 cellules par puits en milieu αMEM complet ou EGM2 1% ASP. Les acquisitions sont réalisées à J3 et J7 (Figure 21). Pour les deux types de milieu de culture, nous observons des sphéroïdes bien arrondis. Ce protocole semble donc être adapté à la constitution de sphéroïdes à partir de MSC-G. De

plus, l'utilisation d'un milieu ou l'autre semble convenir à notre projet.

**Contrairement à la constitution de sphéroïdes de SVF parodontale, le protocole de centrifugation mis en œuvre s'est avéré propice à la formation de sphéroïdes de MSC-G. Les deux milieux de cultures testés sont appropriés et ont permis un suivi de ces derniers sur une cinétique de 7 jours.**

#### 5. Caractérisation d'une greffe de biohybride d'ASC humaines marquées dans un modèle de culture gingivale sur tranche de dentine en cinétique

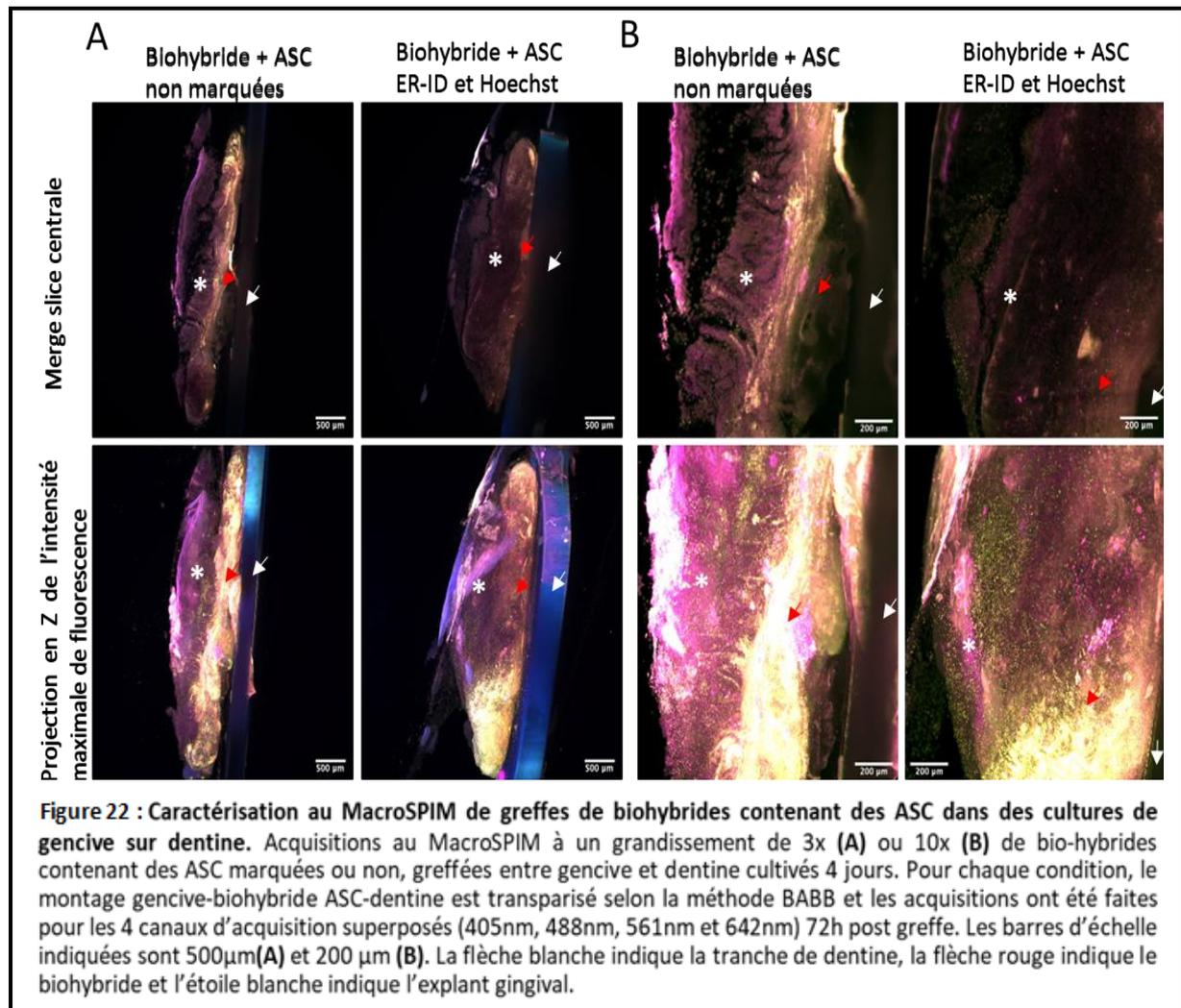
Afin de se situer au plus proche du parodonte physiopathologique et thérapeutique, nous avons conçu un modèle original *ex vivo* de culture d'explant de gencive dont l'objectif est de visualiser la migration des ASC contenues dans l'hydrogel vers la gencive.

##### A. Par imagerie au MacroSPIM

Dans ce contexte, des hydrogels d'ASC marquées ou non ont été greffés entre un explant gingival et une tranche de dentine. L'ensemble est fixé 72h après la greffe du biohybride d'ASC et inclu en agarose puis transparisé en BABB afin d'être imagé au MacroSPIM (Figure 15).

Quatre conditions ont été réalisées : montage gencive sur dentine avec un hydrogel contenant des ASC (ER-ID Red<sup>+</sup> et Hoechst<sup>+</sup>) ; ASC (ER-ID Red<sup>-</sup> et Hoechst<sup>-</sup>) ; ASC (ER-ID Red<sup>+</sup> et Hoechst<sup>-</sup>) ; et ASC (ER-ID Red<sup>-</sup> et Hoechst<sup>+</sup>). Les deux dernières conditions n'ont pas pu être imagées. De plus, dans cette expérience, il manque des contrôles négatifs : montage gencive sur dentine avec hydrogel sans cellules ; et montage gencive sur dentine sans hydrogel. Sur ces acquisitions, l'avantage est que nous différencions les 3 structures : gencive, biohybride et dentine (Figure 22). Dans les canaux 561nm,

642nm et 488nm, lorsque les ASC sont marquées ER-ID Red et Hoechst, nous observons des spots qui pourraient correspondre à des cellules. Cependant, nous visualisons le même type de signal sur l'acquisition du montage où les ASC ne sont pas marquées. Comme ce signal est observé avec les trois lasers, ce n'est donc pas un signal spécifique, cela correspondrait à l'autofluorescence des cellules. Nous notons que l'autofluorescence de l'hydrogel avec ASC non marquées est supérieure à l'autofluorescence de l'hydrogel avec des ASC ER-ID Red<sup>+</sup>.



Nous distinguons davantage cela sur la projection en Z de l'intensité maximale de fluorescence où l'autofluorescence des tissus ne semble pas différer entre les deux conditions, mais une différence est visible au niveau de l'hydrogel. Cela pourrait s'expliquer par le positionnement des structures entre gencive et dentine. De manière générale, nous constatons que l'autofluorescence de l'échantillon est plus importante pour les greffes d'hydrogels contenant des ASC non marquées, en comparaison aux greffes d'hydrogels contenant des ASC marquées ER-ID et Hoechst.

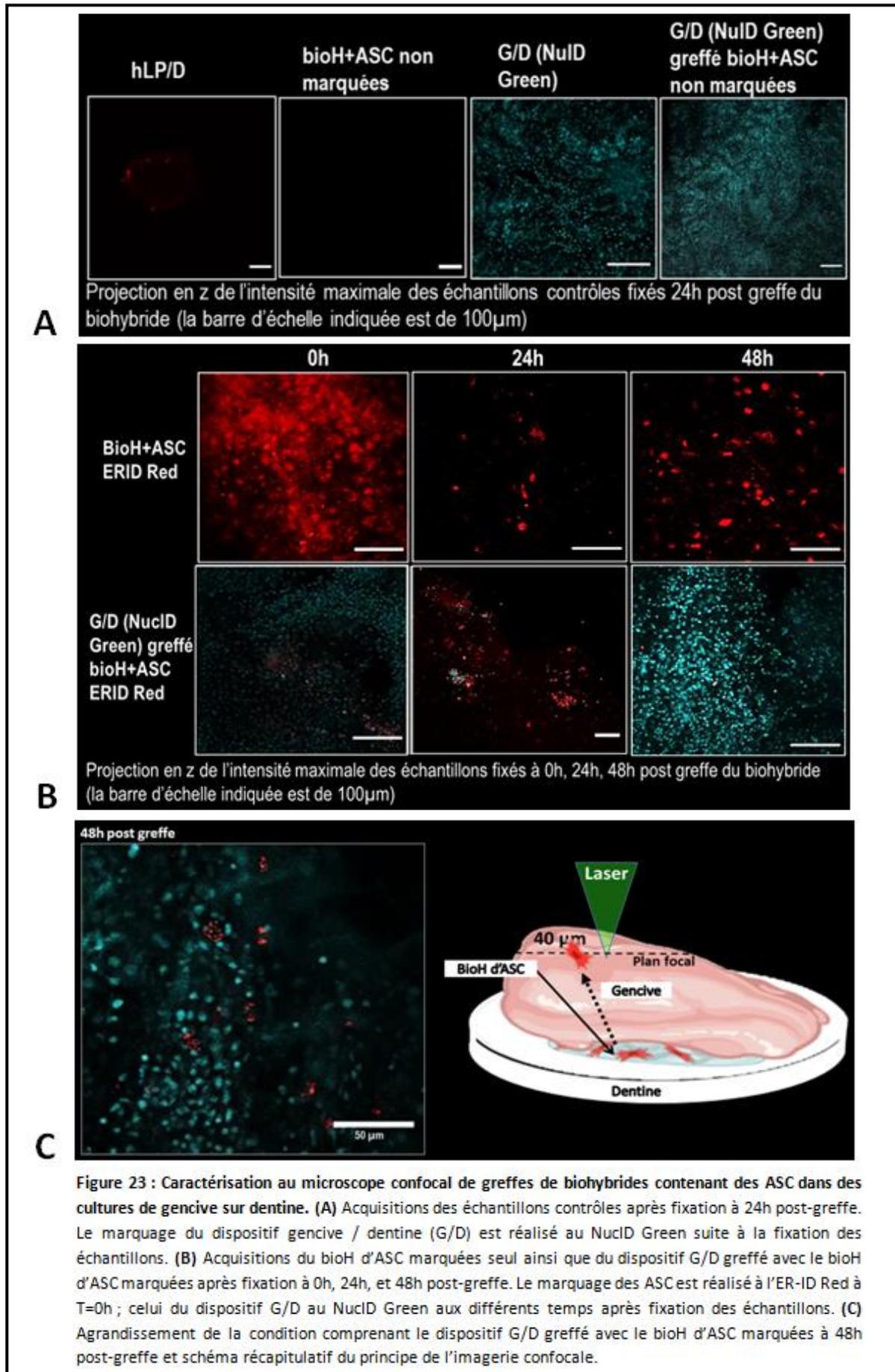
**L'exploration des échantillons au MacroSPIM n'a pas permis de mettre en évidence un signal spécifique relatif aux ASC marquées ER-ID Red et Hoechst.**

## **B. Par imagerie confocale**

Dans ce cas, à  $t=0h$ , les ASC ont été marquées par l'ER-ID Red puis incluses dans l'hydrogel (hLP). Ce biohybride (bioH) d'ASC a ainsi été greffé entre gencive et dentine (G/D). Par la suite, à  $t=24h$  et à  $t=48h$ , le dispositif G/D greffé a été fixé puis marqué au NuCID Green. Six conditions ont été testées : hLP seul sur dentine (hLP/D) ; bioH d'ASC non marquées ; dispositif G/D seul ; dispositif G/D greffé avec bioH d'ASC non marquées ; bioH d'ASC marquées ER-ID Red ; dispositif G/D greffé avec bioH d'ASC marquées.

Le contrôle hLP/D (Figure 23A) met en évidence un signal fluorescent très faible et diffus, pouvant correspondre à l'autofluorescence propre de l'hydrogel, comme suggéré dans les expériences précédentes (Figure 18). Ce marquage n'est pas retrouvé dans le contrôle : bioH d'ASC non marquées. Il serait intéressant d'ajouter un contrôle négatif : bioH d'ASC non marquées sur dentine, afin de vérifier si cette dernière pourrait influencer le signal de fluorescence recueilli. La présence des ASC marquées au sein du biohybride est observée jusqu'à 48h post-greffe (Figure 23B). Concernant le dispositif G/D greffé avec le bioH d'ASC marquées, un signal fluorescent rouge, faible et diffus, est noté à  $t=0h$ , pouvant correspondre à un artefact. A  $t=24h$  et jusqu'à 48h post-greffe, des spots fluorescents rouges sont visualisés sur les acquisitions (Figures 23B et 23C), semblant indiquer que les ASC marquées auraient migré vers la gencive.

**La présence des ASC marquées à l'ER-ID Red, au sein du biohybride, a été retrouvée jusqu'à 48h post-greffe. Au sein du dispositif G/D greffé avec le biohybride d'ASC marquées, l'observation de spots fluorescents rouges, à  $t=24h$  et jusqu'à 48h post-greffe, semble signer la migration des ASC marquées vers la gencive.**



## IV. Discussion

### 1. Optimisation des marquages cellulaires en vue de l'exploration des interactions ASC/MSC-G au sein des modèles expérimentaux

Le but de ce travail a été de présenter et résumer les résultats liés à la mise au point des modèles expérimentaux afin d'étudier les interactions entre ASC exogènes et MSC endogènes dans les procédures d'ingénierie tissulaire. La thérapie cellulaire des parodontites par ASC suggère que ces cellules améliorent le recrutement et l'engagement des progéniteurs parodontaux endogènes, les MSC-G, responsables de la régénération tissulaire (69). Afin d'étudier les interactions ASC/MSC-G, nous avons pu identifier une sonde fluorescente (ER-ID Red) qui marque de manière fiable les ASC en culture 2D, sur la base du maintien de l'intensité de sa fluorescence constante sur 72h ainsi que sur son absence de cytotoxicité (Figure 16). Idéalement, il aurait fallu marquer différenciellement les deux types cellulaires avec des sondes ciblant la morphologie globale de la cellule, mais les MSC-G sont plus difficiles à marquer de façon durable. Plusieurs sondes émettant de la fluorescence dans le vert ( $\lambda = 530 \text{ nm}$ ) ont été testées et sont souvent cytotoxiques pour ce type cellulaire, contrairement à ce que rapporte la littérature (92). Cette différence pourrait résulter du nombre de passage (entre P1 et P6 dans notre étude) que subissent les cellules en culture avant d'être marquées. En effet, comme suggéré par António J. Salgado *et al.* (93), le sécrétome varie en fonction du nombre de passages. Par analogie, il est possible que plus les cellules subissent de passages, plus elles évoluent vers la sénescence, et ainsi elles seront dans l'incapacité d'expulser le marqueur et auront tendance à le maintenir. Le nombre de passage est un paramètre qui mérite d'être étudié car il influence le comportement cellulaire, dont la migration (92). Des études supplémentaires seront nécessaires pour évaluer l'interaction et les échanges de matériels potentiels entre les deux types cellulaires, en s'affranchissant du marquage des MSC-G, ainsi que pour approfondir l'analyse des propriétés de l'ER-ID Red en termes d'innocuité relative à l'activité métabolique des ASC.

Il est important de noter que le marquage du réticulum endoplasmique des ASC par la sonde ER-ID Red ne nous permet pas de caractériser, de façon fiable, le comportement des ASC au sein d'un hydrogel en cinétique par de l'imagerie 3D. En effet, pour analyser la taille et la circularité des cellules, il faudrait disposer d'un marquage cytoplasmique ou membranaire. De plus, nos résultats dans ces phases précoces restent à valider en augmentant les temps intermédiaires (par exemple 0h, 8h, 16h, 24h, 72h), ce qui serait pertinent pour analyser la dynamique du marquage en 3D ainsi que la morphologie des ASC dans l'hydrogel. Par ailleurs, afin d'optimiser la détection de ce marquage, augmenter le nombre de cellules par hydrogel, en restant dans un taux similaire à celui utilisé en thérapie clinique (par exemple 125 000 cellules au lieu de 50 000 cellules dans 300 $\mu\text{L}$  d'hydrogel), serait nécessaire. De plus, nous avons noté une diminution du marquage ER-ID Red des ASC entre  $t=0\text{h}$  et  $t=72\text{h}$ , qui pourrait être due à un photoblanchiment du marqueur, à une mort cellulaire, ou bien à une dilution par prolifération cellulaire (Figure 17B). Pour cela, il faudrait réaliser les marquages directement sur l'hydrogel contenant les ASC, avant sa fixation et à chaque temps d'étude, bien que beaucoup de difficultés relatives à la pénétration des marqueurs et à la génération du bruit de fond aient été rencontrées par l'équipe de recherche (90). Augmenter le temps ou le nombre de lavages du biohybride permettrait peut-être de pallier cette difficulté. Néanmoins, dans le but d'identifier si les marquages influencent la viabilité des ASC au sein d'un hydrogel, des coupes

en agarose pourront être réalisées afin de quantifier la prolifération (Ki67) et l'apoptose (Caspase 3), mais l'analyse tridimensionnelle sera perdue.

Il pourrait être intéressant de tester les marqueurs membranaires fluorescents PKH26 (red) et PKH67 (green) sur les deux types cellulaires étudiés, dans l'optique de disposer d'un marquage différentiel pour chaque type cellulaire et d'obtenir des informations plus précises sur la morphologie et le comportement des cellules. Ces marqueurs ont été utilisés avec succès dans différents articles, notamment sur des MSC humaines (80,94). A ce titre, Shah *et al.* (94) ont décrit un protocole de marquage comprenant de légères optimisations par rapport aux recommandations du fabricant. Nous pourrions ainsi, à partir d'expériences préliminaires de culture 2D, évaluer de manière simple et rapide si des échanges de matériel cellulaire sont mis en jeu par co-localisation des marquages. D'autre part, l'utilisation de quantum dots (QD) constitue une alternative pertinente pour notre projet. Il s'agit de nanoparticules semi-conductrices hautement fluorescentes (environ 10 à 20 fois plus brillantes que les protéines fluorescentes) adaptées à la fois à l'imagerie *in vitro* et *in vivo* (95). Contrairement aux colorants organiques ou aux protéines fluorescentes, ces quantum dots sont très peu sensibles aux dégradations chimiques et métaboliques, et possèdent une excellente photostabilité leur conférant une très bonne résistance au phénomène de photoblanchiment (96,97). Ainsi, ces nanoparticules permettent des marquages à long-terme avec maintien de l'intensité de fluorescence pendant une période prolongée (95). Cette propriété est particulièrement intéressante pour le suivi en temps réel de processus intracellulaires, à l'échelle biomoléculaire. A l'inverse des agents fluorescents conventionnels, leur spectre d'émission étroit et leur spectre d'excitation large rendent possible les marquages multiples et leur détection simultanée, via l'activation d'une seule longueur d'onde, afin d'étudier plus aisément les processus relatifs au développement natif et à la régénération tissulaire (95). A ce titre, Gao *et al.* (98) ont pu visualiser des marquages de divers composants cellulaires en concomitance (noyau, protéine Ki67, mitochondries, microtubules, actine) à l'aide de 5 sondes colorées de type quantum dots, par excitation d'une simple longueur d'onde (99). De plus, leur très petite taille permet de réaliser des marquages cellulaires sans risque de modifications conséquentes du comportement et de l'activité des cellules cibles. En effet, de nombreux articles mentionnent l'absence d'interférences significatives des quantum dots sur les caractéristiques fonctionnelles des MSC *in vitro* (95–97). Shah *et al.* (95) ont montré que des MSC humaines marquées par quantum dots, à une concentration comprise entre 20 et 50 nM, demeuraient viables et continuaient à proliférer pendant au moins 22 jours, tout en maintenant ce dernier dans leur cytoplasme, sans entraîner d'interférences relatives à leur capacité de différenciation. Après optimisation, la concentration de 30 nM de quantum dots a été retenue par les auteurs pour marquer ces MSC humaines avec un protocole basé sur une incubation « overnight ». De plus, Wang *et al.* (100) ont mis en évidence qu'une concentration en quantum dots (CdSe/ZnS) de 0,75 µg/mL n'entraînait pas de modifications morphologiques, ni d'altérations dans l'expression des marqueurs de surface spécifiques tels que CD29, CD44, CD90, CD105 au sein de MSC humaines sur une période de 4 jours, avec notamment un maintien de la viabilité cellulaire supérieur à 80%. Plus récemment, le développement de quantum dots basé sur la fluorescence proche infrarouge (NIR), et plus particulièrement sur la fluorescence proche infrarouge correspondant à la 2<sup>ème</sup> fenêtre (NIR-II : 1000 - 1700nm), ouvre de nouvelles perspectives pour l'exploration tissulaire. En effet, ces derniers présentent l'avantage considérable de pénétrer en profondeur au sein des tissus (au-delà de 2 cm) par comparaison aux agents fluorescents correspondant au domaine du visible ou à la 1<sup>ère</sup> fenêtre du proche infrarouge (NIR-I : 700 - 1000nm), avec notamment une meilleure résolution spatiale et

temporale ainsi qu'une réduction importante de l'autofluorescence des tissus (101,102). A ce titre, l'Ag<sub>2</sub>S QD NIR-II a montré son efficacité et son innocuité pour marquer des MSC humaines ensemencées au sein d'un vecteur de collagène en 3D. Ainsi, sur 30 jours de culture au sein du vecteur, aucune différence significative n'a été retrouvée en termes de prolifération cellulaire, de capacités de différenciation et de potentiel souche, par comparaison aux cellules non marquées (96). Ce type de sonde constitue donc une stratégie prometteuse à tester sur nos modèles, notamment pour l'imagerie en temps réel et en profondeur au sein des tissus.

## **2. Etude des interactions ASC/MSC-G au sein des modèles 3D expérimentaux dans le cadre du processus de régénération parodontale**

La base des deux modèles développés dans ce projet est un hydrogel de lysat plaquettaire (hLP), une structure poreuse, bioactive, qui répondrait parfaitement à l'objectif de colonisation du greffon par les vaisseaux, et permettrait la rétention et la délivrance prolongée de facteurs de croissance (issus du LP *per se*, de l'activité paracrine des ASC et des facteurs de croissance de l'hôte) (89). Sarkar *et al.* (103) ont conclu dans leur étude que le hLP n'a aucun effet sur la régénération des lésions osseuses alors que d'autres ont montré que le hLP, avec ou sans ASC, induisait la régénération osseuse alvéolaire. Cependant, seule l'association du hLP aux ASC humaines a démontré, avec succès, la régénération du ciment et du ligament parodontal (104).

### **A. Modèle *ex vivo* « gencive-like » (encore appelé modèle *in toto*)**

Dans le modèle *ex vivo* de greffe d'ASC dans le tissu conjonctif gingival sur tranche de dentine, que nous développons afin de mimer la procédure de thérapie cellulaire chez l'Homme, le suivi des ASC en 3D s'est avéré complexe. Dans l'objectif de caractériser l'ensemble du montage de l'hLP d'ASC entre le prélèvement de gencive et la tranche de dentine, de par sa taille et son épaisseur, il est indispensable de transparer l'échantillon, pour favoriser la pénétration de la feuille de lumière au MacroSPIM. En effet, nous observons des « spots » fluorescents qui pourraient correspondre à l'auto-fluorescence des cellules (Figure 22), soulevant l'hypothèse que la transparation les rendrait auto-fluorescentes ou leur ferait perdre leur marquage ER-ID Red. Pour cela, il serait intéressant de vérifier si la fluorescence de l'ER-ID Red liée aux ASC observées dans l'hydrogel, à t=0h non greffé (Figures 17 et 18), est maintenue après transparation. S'il s'avère que ce n'est pas le cas, il faudra s'affranchir de la transparation. Face aux contraintes rencontrées, relatives à l'imagerie au MacroSPIM, nous avons décidé, en parallèle, d'explorer le modèle par imagerie confocale afin de tenter de mettre en évidence la migration des ASC au sein de l'explant gingival. Ce type d'imagerie ne met pas en jeu d'étape de transparation de l'échantillon et permet de visualiser un plan focal en particulier, limitant ainsi le phénomène de fluorescence parasite liée aux autres plans de l'échantillon, ce qui s'avère pratique dans le cadre de notre objectif. La présence de spots fluorescents rouges retrouvés pour l'ensemble du dispositif gencive/dentine greffé avec le biohybride d'ASC marquées, à 24h et 48h (Figures 23B et 23C), semble donner un signal fort en faveur d'une potentielle migration des ASC au sein de l'explant gingival. La microscopie par génération de seconde harmonique (SHG) apporterait une aide complémentaire, en permettant d'objectiver la différence de structure entre le biohybride (sans collagène) et la gencive (avec collagène) du dispositif. L'expérience au microscope confocal ayant été réalisée une seule fois, il est fondamental de la reproduire en tentant notamment d'augmenter la cinétique jusqu'à 72h ou 96h post-greffe. Pour la suite des tests, il serait judicieux de laisser les ASC marquées à l'ER-ID Red

dégorger le marqueur plus longtemps avant de les incorporer au sein de l'hydrogel (plutôt 3 à 5h contre les 30min effectuées). En effet, le marquage observé à 24h est plus spécifique que celui à 0h (Figure 23B) qui demeure diffus et qui pourrait être dû au relargage du marqueur par les cellules présentes dans l'hydrogel. Une autre hypothèse à envisager concerne le passage éventuel des cellules du biohybride vers la gencive, par la pression exercée via la lamelle sur l'échantillon en vue de son observation au microscope. Cette probabilité demeure cependant faible car le tissu gingival est particulièrement dense. Ainsi, afin de tester cette hypothèse, et après avoir exploité les échantillons au microscope confocal, il serait intéressant de les analyser en histologie 2D. Nous pourrions également ajouter des conditions contrôles supplémentaires, en remplaçant les ASC par des fibroblastes (NIH-3T3), dans le but de montrer que le résultat observé pour les ASC est bien spécifique et ne dépend pas d'une migration « passive » de ces dernières au sein de la gencive.

D'autre part, nous tenterons d'imager l'explant gingival selon différentes orientations, en le retournant et le visualisant par la face conjonctive (côté greffe) plutôt que par la face épithéliale, dans le but de pénétrer plus facilement en profondeur dans l'échantillon. Nous pourrions également, après fixation préalable de l'échantillon, effectuer une incision au centre du complexe tissulaire, sans déstructurer l'architecture globale, pour l'imager avec un microscope biphotonique droit (Annexe 8) afin de localiser les cellules, visualiser leur migration en dehors de l'hydrogel et leur potentielle infiltration dans le tissu gingival. La mise en œuvre de la microscopie biphotonique au niveau de l'incision sera plus aisée que le positionnement de la feuille de lumière. De plus, la profondeur de pénétration et la résolution seront meilleures, avec un accès à un plus large éventail des longueurs d'ondes qu'avec le MacroSPIM. Les tissus sont composés de multiples types cellulaires, organisés très précisément au sein d'un réseau fonctionnel, avec les composants de la matrice extra-cellulaire (105), un micro-environnement en constante évolution dont il faut tenir compte lors de l'élaboration d'une stratégie d'ingénierie tissulaire. Dans le but de toujours approcher de plus près la réalité clinique, nous envisagerons, au sein de notre modèle *in toto*, de léser initialement la gencive afin de vérifier si les ASC sont attirées sur le site lésé. A ce titre, il sera également fondamental de réaliser l'expérience sur gencive inflammatoire, afin d'inclure les composantes immuno-inflammatoires du microenvironnement relatif à la maladie parodontale.

L'étude approfondie du modèle *in toto*, via ces différentes techniques d'imagerie complémentaires, permettra de confirmer la migration et l'infiltration des ASC au sein de l'explant gingival. Ainsi, une des questions fondamentales sera de déterminer si les ASC qui ont migré dans la gencive présentent le même phénotype d'origine. A ce titre, des analyses immunohistologiques pourront être effectuées à partir de marqueurs de différenciation tels que l'ostéocalcine (OC : synthétisée exclusivement par les cellules ostéoblastiques lors du stade tardif de maturation), Cbfa-1 (marqueur précoce de différenciation ostéogénique), la sialoprotéine osseuse (BSP), l'ostéopontine (OPN : lignée ostéo-cémentogénique) et  $\alpha$ -SMA (lignée endothéliale, myofibroblastes). Il sera alors intéressant de visualiser la co-localisation entre ces différents marquages et le signal fluorescent rouge des ASC afin d'évaluer la proportion d'ASC exogènes engagées dans le processus de différenciation cellulaire. De plus, nous aurons la possibilité de mettre en évidence la proportion de cellules endogènes différenciées et de la comparer aux différents temps de traitement. Bien que cette expérience ne nous permette pas de définir le phénotype précis des cellules observées, elle nous fournira des informations précieuses sur le mécanisme potentiel mis en jeu par les ASC au cours du processus de régénération parodontale, à savoir un effet direct (régénération due essentiellement à la différenciation des ASC exogènes greffées) ou indirect (régénération majoritairement due à la

stimulation des progéniteurs endogènes). De manière complémentaire, les ASC marquées présentes au sein de l'explant gingival pourront être spécifiquement récupérées par cytométrie en flux (tri cellulaire) afin d'analyser, notamment par des techniques de PCR, l'expression de différents gènes étroitement liés au potentiel thérapeutique des MSC, à savoir ceux relatifs à la différenciation cellulaire comme abordé précédemment, à la pluripotence cellulaire (Oct-3, Oct-4, Nanog, Sox2, SSEA-3, SSEA-4), aux propriétés pro ou anti-inflammatoires (TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10, IDO, PGE2), ainsi qu'à leur potentiel pro-angiogénique (VEGF) et à l'apoptose (caspase 3). Il sera ainsi possible de les quantifier et de les comparer, aux différents temps, afin d'obtenir des informations sur le comportement des ASC ainsi que sur un changement éventuel de leur phénotype initial (pré-greffe).

Pour aller plus loin et déterminer de manière fiable le phénotype des ASC récoltées via la cytométrie en flux, la technique de séquençage ARN (RNA sequencing ou RNA-seq) constituera une approche pertinente. Il faudra cependant s'assurer d'obtenir une qualité et une quantité d'ARN suffisante. Ainsi, nous aurons accès au transcriptome entier des ASC que nous pourrions comparer aux différents temps de l'expérience. Cette approche, très informative, rendra possible l'analyse exhaustive de l'ensemble des gènes exprimés au sein du pool d'ASC récupérées, fournissant des informations essentielles sur leur phénotype ainsi que sur leur mécanisme d'action potentiel (106). D'autre part, le recours à la technique de « single-cell RNA-seq » permettrait d'affiner encore notre degré d'analyse en nous offrant la possibilité d'étudier précisément l'ensemble des populations cellulaires présentes au sein de l'explant gingival, dont les MSC-G en pré- et post-greffe. Cette technique, complexe et onéreuse, reposant sur des analyses bioinformatiques poussées, fournit la capacité d'évaluer le transcriptome de chaque cellule composant un échantillon et ainsi de les classer en différents clusters. Cet outil très puissant permet de suivre l'évolution de différents types cellulaires, y compris de noter l'apparition ou la disparition d'un type cellulaire en particulier (107–112). Nous pourrions ainsi analyser la différenciation cellulaire des MSC-G selon diverses lignées. De plus, il serait intéressant d'étudier le paramètre de sénescence cellulaire au sein de la population de MSC-G et de contrôler son évolution après la greffe. Ce paramètre, étroitement lié aux pathologies inflammatoires chroniques, pourrait nous apporter des informations supplémentaires sur le potentiel thérapeutique de la greffe d'ASC exogènes vis-à-vis des MSC-G endogènes, notamment via l'analyse de l'expression de gènes tels que CDKN1A (p21), CDKN2A (p16), GLB1, CCN1, NOTCH3, ainsi que d'autres marqueurs plus spécifiquement associés au phénotype « SASP » (CEBPB, MAP2K3, IRF5, IRF7, co-expression de EREG/IL1B, de ICAM1/CDKN1A, et de JUN/CDKN2A) (113–115). La pertinence de ces analyses sera renforcée par l'utilisation d'explants provenant de gencive inflammatoire au sein de notre modèle *in toto*.

Bien que l'objectif de notre projet concerne l'étude des interactions entre les ASC exogènes transplantées et les MSC-G endogènes dans le cadre du processus de régénération parodontale, l'apport de la technique de « single-cell RNA-seq » sur notre modèle *in toto* pourrait nous donner accès à une mine d'informations sur l'évolution du microenvironnement relatif à l'explant gingival suite à la greffe d'ASC, notamment sur le plan immunitaire. L'efficacité et la pérennité du processus de régénération tissulaire étant fortement corrélées à la résolution du processus inflammatoire chronique, il serait intéressant d'analyser, en parallèle, le profil des cellules immunitaires en pré- et post-greffe. Ainsi, nous pourrions tester si la greffe d'ASC est susceptible de faire évoluer les effecteurs de l'immunité vers des phénotypes régulateurs plutôt que pro-inflammatoires. A ce titre, nous pourrions évaluer le ratio de macrophages M1 (à caractère pro-inflammatoire) et M2 (à

caractère anti-inflammatoire) au sein des divers échantillons, ou bien le ratio de macrophages CD68+ connus pour être associés à la rupture du collagène et à la sévérité de la parodontite. Le suivi du ratio lymphocytes Th17/Treg s'avère également être un paramètre essentiel, les lymphocytes Th17 ayant un rôle clé dans la pathogénèse de la parodontite et l'entretien de la chronicité de la réponse inflammatoire. D'autre part, il serait judicieux de quantifier la proportion de lymphocytes B exprimant le ligand RANKL, ce dernier étant très peu retrouvé chez les lymphocytes B des tissus sains, mais présent chez plus de 90% des lymphocytes B associés aux lésions parodontales (20).

### **B. Modèle *in vitro* « gencive-like »**

Dans ce projet, un modèle supplémentaire de reconstitution « gencive-like » *in vitro* est développé, selon lequel un sphéroïde de SVF parodontale ou de MSC-G à P1 est constitué et cultivé au sein d'un hLP support d'ASC. L'avantage de ce modèle est la possibilité d'étudier au SPIM des cellules vivantes en temps réel, sans transparaissance, contrairement au modèle de greffe *in toto*. Par ailleurs, les sphéroïdes de SVF représentent plus fidèlement l'hétérogénéité tissulaire que les sphéroïdes formés à partir de MSC-G. Nous pourrions ainsi mieux prendre en compte l'effet immunomodulateur, pro-angiogénique, ou pro-différenciant des ASC sur les progéniteurs de la SVF. Néanmoins, la génération de sphéroïdes de SVF parodontale demande beaucoup de mises au point. En effet, le protocole de centrifugation utilisé ne semble pas être favorable à la formation de ce type de sphéroïdes (Figure 19), contrairement aux sphéroïdes de MSC-G (Figure 21). Pour constituer des sphéroïdes de SVF parodontale, il serait pertinent de tester le protocole en agitation lente et continue, à 37°C ; 5% CO<sub>2</sub> (Annexe 9), en évitant la lyse des globules rouges qui semble entraîner un stress trop important à l'ensemble des cellules (Figure 20). De plus, l'étude de l'organisation interne des deux types de sphéroïdes, par immunomarquage sur coupe, serait importante.

Bien que ce modèle soit plus éloigné de la réalité clinique, il s'avère très intéressant pour explorer, à l'échelle cellulaire et moléculaire, l'interaction entre les ASC exogènes greffées et les MSC-G endogènes. Selon la littérature, la théorie « hit-and-run » est actuellement privilégiée pour expliquer l'efficacité des MSC transplantées à promouvoir le processus de régénération tissulaire (48,116,117). En effet, cette théorie s'appuie sur la courte demi-vie observée des MSC greffées au sein de microenvironnements inflammatoires, suggérant une activité éclair de ces dernières. Ainsi, le mécanisme d'action des MSC transplantées reposerait principalement sur la sécrétion de facteurs solubles et de vésicules extracellulaires (contenant des protéines, des lipides, des métabolites, des acides nucléiques, ainsi que des mitochondries) afin d'induire le recrutement et l'engagement des progéniteurs endogènes à l'origine de la régénération tissulaire. Il convient cependant de rappeler que l'état inflammatoire chronique contribue à la survenue d'altérations au sein des MSC endogènes, pouvant les mener vers un état de sénescence précoce avec acquisition du phénotype pro-inflammatoire « SASP ». Leurs capacités de prolifération, différenciation, migration et recrutement sur site demeurent ainsi compromises, et se trouvent associées à des altérations de leurs fonctions mitochondriales (50). Ce phénotype est capable de se transmettre de proche en proche aux MSC voisines et entraîne, non seulement, une réduction de leurs capacités régénératives, mais participe également à l'entretien de la réponse inflammatoire chronique. Dans un tel contexte, il est légitime de se demander comment la présence si transitoire des MSC greffées peut-elle aboutir à un processus de régénération tissulaire fiable et pérenne ?

Ce constat pourrait s'expliquer par la capacité des MSC transplantées à induire des modifications profondes et durables au sein des cellules cibles endogènes, par le biais d'évènements de reprogrammation cellulaire, et notamment de reprogrammation métabolique. A ce titre, le processus de transfert mitochondrial fait actuellement l'objet de nombreuses études et tiendrait un rôle important dans ce phénomène (118–121). En effet, il a été démontré que les MSC transfèrent de manière abondante des mitochondries aux macrophages, les orientant vers un phénotype régulateur M2. De plus, le transfert mitochondrial des MSC vers les lymphocytes T favorise, non seulement, la production de lymphocytes Treg, mais entraîne également la conversion des lymphocytes Th17 en Treg (122). Ce processus de transfert mitochondrial a été mis en évidence par Luz-Crawford *et al.* (123) dès 4h de co-culture entre des BMSC et des lymphocytes T, sans avoir réalisé au préalable de pré-incubation des BMSC avec des cytokines pro-inflammatoires. De la même manière, ces expériences suggèrent que les MSC greffées pourraient être capables, notamment via le processus de transfert mitochondrial, de restaurer les fonctions et l'activité respiratoire des MSC endogènes endommagées, indispensables à leurs capacités régénératives (120,124,125). Par conséquent, au sein de notre modèle, cette réflexion nous amène aux questions suivantes : Est-ce que les ASC exogènes greffées seraient capables de transférer des mitochondries aux MSC-G endogènes, et de promouvoir ainsi l'acquisition d'un phénotype régulateur (anti-inflammatoire) chez ces dernières ? Et si ce transfert mitochondrial est avéré au sein des MSC-G endogènes, favorise-t-il leur potentiel de différenciation ?

Afin de tenter de répondre à ces questions, nous pourrions envisager à l'aide de sondes quantum dots, comme rapporté par Gao *et al.* (98), de réaliser un double marquage sur les ASC ciblant d'une part les mitochondries et d'autre part le réseau d'actine. Il serait ainsi possible d'évaluer, en temps réel, la migration des ASC greffées vers le sphéroïde de MSC-G non marquées et d'observer si un transfert de mitochondries a eu lieu au sein des MSC-G, en déterminant la durée précise au bout de laquelle cet évènement est intervenu. Par la suite, il serait judicieux de récupérer spécifiquement les MSC-G ayant internalisé des mitochondries marquées afin d'effectuer un « RNA-seq » pour analyser l'évolution de leur transcriptome et les répercussions sur leur phénotype et leurs capacités de différenciation. Ce tri cellulaire pourrait être réalisé par cytométrie en flux en ne récupérant que les cellules mitochondries +/-actine -. Compte tenu de l'autofluorescence potentielle du sphéroïde de MSC-G, le marquage de ces dernières pourrait optiquement gêner la détection de la fluorescence des ASC marquées et de leurs mitochondries. Cependant, nous pourrions tenter l'expérience en privilégiant l'utilisation d'une sonde quantum dots ciblant le noyau des MSC-G, et non leur cytoplasme, afin d'éviter ou de minimiser ce type d'artefact. Ce marquage nous permettrait d'identifier et d'isoler de manière plus fiable les MSC-G. D'autre part, l'observation de la distribution des mitochondries au sein des ASC pourrait s'avérer intéressante dans le cadre de nos explorations microscopiques. En effet, une répartition péri-nucléaire des mitochondries est classiquement retrouvée pour les cellules indifférenciées, tandis qu'elles sont uniformément réparties dans le cytoplasme des cellules différenciées. Le rapport surface mitochondriale/surface cytoplasmique est ainsi connu pour être augmenté chez les cellules différenciées, par comparaison aux cellules indifférenciées (125,126). Par conséquent, nous pourrions obtenir, simplement par des techniques d'imagerie, des indices précieux relatifs au devenir des ASC post-greffe. Au sein de ce modèle, il sera important également de réaliser des tests avec des sphéroïdes provenant de MSC-G extraites à partir de gencive inflammatoire afin de comparer les résultats obtenus.

L'utilisation de la spectroscopie Raman pourrait présenter un intérêt réel dans le cadre de ce modèle afin d'évaluer la différenciation cellulaire des MSC-G. Contrairement aux techniques classiques mises en œuvre (Immunohistochimie, Cytométrie en flux, RT-PCR, Hybridation *in situ* d'ARN, Western blot, Gel d'électrophorèse, etc.), cette approche permet l'étude de la différenciation cellulaire, à l'échelle de la cellule unique, de manière non invasive et non destructrice vis-à-vis de l'échantillon (pas ou peu de préparation de ce dernier) et autorise ainsi une analyse sur cellules vivantes sans nécessiter un marquage préalable des cellules (127–129). Cette technique a été largement mise en application au cours des dernières années pour l'étude sur cellules vivantes du processus d'apoptose, de la distribution du pH intracellulaire, et de l'identification des types cellulaires (127). Par le biais de l'exploration des états vibrationnels moléculaires, cette dernière fournit des informations globales sur les composants biochimiques (protéines, lipides, acides nucléiques, polysaccharides) des cellules ou tissus contribuant à l'obtention de signatures cellulaires biochimiques ou d'empreintes spectrales caractéristiques de types cellulaires spécifiques et/ou de processus biologiques particuliers (130,131). Lazarevic *et al.* (128) ont ainsi analysé des hPDLSC indifférenciées et différenciées (selon les lignées ostéogénique, chondrogénique, et adipogénique) via la spectroscopie Raman et ont mis en évidence une distinction claire entre ces groupes. De plus, Kim *et al.* (129) ont mis en œuvre une technique de cartographie 3D basée sur la spectroscopie Raman, dans le but d'étudier la différenciation odontogénique au sein de sphéroïdes de hDPSC, par l'évaluation de pics spectraux spécifiques correspondant notamment à l'hydroxyapatite et au  $\beta$ -carotène (précurseur de l'hydroxyapatite). La différenciation des MSC en lignées ostéogéniques ou adipogéniques peut également être objectivée, sur la base des empreintes Raman associées au niveau de production d'os minéral ou de lipides. Le couplage de la spectroscopie Raman aux approches de « machine learning » s'avère très prometteur afin de caractériser le processus de différenciation des cellules souches. A ce titre, l'étude de Geng *et al.* (130) a été la première à suivre les changements graduels intervenant dans ce processus au sein de hNSC. Les auteurs ont ainsi pu mettre en évidence huit éléments spectraux, comme biomarqueurs fiables de la différenciation cellulaires des hNSC. Cette approche serait particulièrement utile dans le cadre de notre modèle, et permettrait une réduction des besoins en échantillons et un gain de temps considérable dans leur analyse. Cette technique ouvre la voie à la cartographie des tissus biologiques complexes, à l'échelle de la cellule unique, (130) et suscite ainsi de nombreux espoirs, notamment pour l'analyse de notre modèle *in toto*.

Finalement, un troisième modèle consistant à cultiver un explant gingival directement dans l'hLP d'ASC pourrait être testé. Ce modèle sera à mi-chemin entre les sphéroïdes de SVF parodontale ou de MSC gingivales en hydrogel d'ASC et le modèle de greffe qui reste le plus proche de la situation clinique.

### **C. Intérêts et complémentarité des modèles**

Les trois modèles présentés dans le cadre de ce projet permettent chacun d'apporter des informations spécifiques relatives à l'exploration des interactions ASC/MSC-G (Tableau 2). La complémentarité de ces modèles offre ainsi de solides bases pour décrypter les mécanismes d'action de la thérapie cellulaire parodontale basée sur l'utilisation des ASC.

**Tableau 2 : Principales caractéristiques des différents modèles :**

Modèles	Avantages	Limitations
<b>Modèle in toto "gencive-like"</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Reflète le plus fidèlement la réalité clinique et la situation de greffe.</li> <li>- L'explant de gencive correspond au ratio réel de MSC-G retrouvé au sein des tissus.</li> <li>- En plus de l'étude de l'effet pro-différenciant des ASC sur les MSC-G endogènes, ce modèle offre la possibilité d'analyser leurs effets immunomodulateurs et pro-angiogéniques entre autres.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Modèle présentant une épaisseur importante ainsi que des tissus de nature différente à l'origine de diverses interfaces pouvant rendre son exploration complexe.</li> <li>- Etape de transparisation nécessaire pour imager les échantillons au MacroSPIM.</li> <li>- Analyse en temps réel sur cellules vivantes difficile à mettre en œuvre.</li> </ul>
<b>Modèle in vitro de sphéroïde de SVF parodontale ou de MSC-G au sein du biohybride d'ASC</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Permet une étude sans transparisation et en temps réel sur cellules vivantes au SPIM.</li> <li>- Modèle plus facile à explorer d'un point de vue cellulaire et moléculaire.</li> <li>- La réalisation de sphéroïde à partir de MSC-G offre une certaine reproductibilité au modèle et permet d'étudier de manière plus spécifique l'interaction entre les ASC et les MSC-G.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- La caractérisation des sphéroïdes nécessite un travail de mise au point long et rigoureux.</li> <li>- La réalisation de sphéroïdes à partir de SVF parodontale est particulièrement complexe en raison des divers types cellulaires mis en jeu.</li> <li>- Les sphéroïdes formés par les MSC-G correspondent à un extrait pur de MSC-G présentes en grand nombre et demeurent ainsi éloignés du ratio réel de MSC-G retrouvé au sein des tissus.</li> </ul>
<b>Modèle ex vivo d'explant gingival au sein du biohybride d'ASC</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Permet une étude sans transparisation et en temps réel sur cellules vivantes au SPIM (offre une alternative intéressante à l'imagerie complexe relative au modèle in toto).</li> <li>- L'explant de gencive correspond au ratio réel de MSC-G retrouvé au sein des tissus.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- L'explant gingival étant présent au sein du biohybride d'ASC, ce modèle reflète moins bien la réalité clinique que le modèle in toto.</li> </ul>

### 3. Perspectives

Dans la continuité de notre démarche, afin de consolider et d'exploiter de la manière la plus exhaustive possible nos modèles 3D expérimentaux, des expériences intéressantes à mener dans le cadre des différentes phases de notre projet sont présentées dans le tableau suivant (Tableau 3).

**Tableau 3 : Tableau récapitulatif des expérimentations à mener et de leurs objectifs dans le cadre des différentes phases de notre projet :**

	Expériences à réaliser	Objectifs recherchés
<p><b>Culture cellulaire en 2D</b></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Tester les marqueurs membranaires fluorescents PKH26 (red) et PKH67 (green) sur les ASC et les MSC-G ainsi que des marquages par quantum dots, en particulier ceux basés sur la fluorescence proche infrarouge correspondant à la 2<sup>ème</sup> fenêtre (NIR-II).</li> <li>- Etude au vidéomicroscope d'une co-culture 2D ASC/MSC-G sur une cinétique de 72h : si un marquage différentiel a pu être mis au point pour chacun des types cellulaires, nous chercherons à identifier une co-localisation de ces marquages. Possibilité également de récupérer spécifiquement les 2 types cellulaires et de réaliser un « RNA-seq » pour évaluer l'évolution du phénotype et du transcriptome cellulaire en prenant en compte l'aspect contact cellulaire. Si seules les ASC ont pu être marquées (ER-ID Red) et que les MSC-G sont non marquées, tester si les MSC-G présentent au cours du temps un gain de fluorescence au détriment des ASC initialement marquées. Tenter de mettre cela en évidence par réalisation d'une segmentation corrélée au signal de fluorescence.</li> <li>- Réaliser une co-culture 2D ASC/MSC-G en chambre de Boyden sur une cinétique de 72h avec un filtre de porosité fine afin que les 2 types cellulaires ne puissent pas se mélanger. Récupération des cellules en fin d'expérience et évaluation de leur transcriptome et de leur phénotype par « RNA-seq » ou utilisation de techniques plus classiques telles que la PCR.</li> <li>- Récupérer les surnageants et les soumettre à des tests (« inflammation and cytokine assays ») permettant d'identifier et quantifier un panel de cytokines en rapport avec l'inflammation au sens large.</li> <li>- Tester des MSC-G provenant de gencive inflammatoire.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Obtenir un marquage différentiel pour chaque type cellulaire et bénéficier d'informations précises sur la morphologie et le comportement des cellules. Les marquages par quantum dots NIR-II sont très bien adaptés à l'imagerie en profondeur des tissus, comme le requièrent nos modèles.</li> <li>- Mise en évidence de l'interaction directe entre les 2 types cellulaires par échange de matériel intracellulaire.</li> <li>- Mise en évidence de l'interaction indirecte (effet paracrine) entre les 2 types cellulaires.</li> <li>- Explorer les effets immunomodulateurs des ASC en co-culture avec les MSC-G.</li> <li>- Se rapprocher des conditions cliniques.</li> </ul>
<p><b>Caractérisation du biohybride d'ASC en cinétique par imagerie 3D</b></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Tester des marqueurs membranaires ou cytoplasmiques, tels que ceux décrits précédemment, pour évaluer de manière fiable le nombre, la forme et la taille des cellules sur une cinétique de 72h.</li> <li>- Reproduire les expériences en ajoutant le contrôle négatif : hydrogel avec ASC non marquées (n'ayant pas pu être effectué par manque de cellules).</li> <li>- Introduire des temps intermédiaires (0h, 8h, 16h, 24h, 72h).</li> <li>- Augmenter le nombre de cellules par hydrogel en restant dans un taux similaire à celui utilisé en clinique : passer à 125 000 cellules au lieu de 50 000 cellules dans 300 µL d'hydrogel.</li> <li>- Effectuer en complément des coupes en agarose afin de quantifier la prolifération cellulaire (Ki67) et l'apoptose (Caspase 3).</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Mettre au point les conditions optimales afin d'évaluer l'interaction entre les ASC au sein de l'hLP et le sphéroïde de MSC-G ou l'explant gingival dans la suite des expériences.</li> <li>- Analyser la dynamique du marquage en 3D ainsi que la morphologie des ASC dans l'hydrogel.</li> <li>- Optimiser la détection du marquage.</li> <li>- Identifier si les marquages influencent la viabilité des ASC au sein de l'hydrogel.</li> </ul>

<p><b>Caractérisation de sphéroïdes formés à partir de SVF parodontale ou de MSC-G</b></p>	<p>- Etude de la prolifération, la viabilité, l'organisation et la différenciation des cellules au sein des sphéroïdes sur une cinétique de 7 jours par imagerie 3D et immunofluorescence sur coupes (132–139) :</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Prolifération : marquage Ki67.</li> <li>• Viabilité cellulaire : test <u>qualitatif</u> Live/Dead assay kit calcein acetoxyethyl ester and ethidium homodimer-1 et test <u>quantitatif</u> WST-8 450nm.</li> <li>• Mort cellulaire : marquage Annexine V / Iodure de propidium ou TO-PRO-3 ou 7AAD.</li> <li>• Evaluation de la maintenance du potentiel « souche » au sein des sphéroïdes : Ac Human SSEA-4 conjugué au NHL493 et Ac Human TRA-1-60 conjugué au NL557 utilisés comme marqueurs positifs des cellules souches humaines / Ac Human SSEA-1 conjugué au NL557 utilisé comme marqueur négatif.</li> <li>• Evaluation du potentiel de différenciation : <ul style="list-style-type: none"> <li>- Ostéogénique : marquage à l'Alizarin red S / mesure de l'activité de la phosphatase alcaline.</li> <li>- Adipogénique : marquage à l'Oil red O.</li> <li>- Chondrogénique : marquage à l'Alcian blue.</li> <li>- Endothélial : marquage positif à VEGF / CD31.</li> </ul> </li> <li>• Analyses PCR et western blot possibles en complément pour évaluer le niveau d'expression de différents facteurs d'intérêt relatifs à l'ostéogénèse (Runx2, Osteocalcine, Sp7, DSPP, Osteopontine, BSP, ALP), au potentiel « souche » (OCT-4, NANOG, SOX2, SSEA-4, REX-1), aux propriétés anti-inflammatoires (TSG-6, MnSOD, COX-2) et pro-angiogéniques (VEGF, bFGF).</li> <li>• Mise en œuvre de la spectroscopie Raman pour évaluer de manière rapide, sans marquage préalable et en 3D, la différenciation cellulaire des MSC-G (ou d'autres processus) au sein des sphéroïdes.</li> </ul> <p>- Pour constituer des sphéroïdes de SVF parodontale : tester le protocole en agitation lente et continue à 37°C, 5% CO2 en évitant la lyse des globules rouges qui semble entraîner un stress trop important à l'ensemble des cellules.</p> <p>- Tester des SVF parodontales et des MSC-G provenant de gencives inflammatoires.</p>	<p>- Mise au point des sphéroïdes de SVF parodontale et de MSC-G en vue de leur utilisation au sein du modèle décrit.</p>
<p><b>Modèle in vitro de sphéroïde de SVF parodontale ou de MSC-G au sein du biohybride d'ASC</b></p>	<p>- Tester le marquage des ASC avec 2 sondes quantum dots, l'une ciblant le réseau d'actine et l'autre ciblant les mitochondries afin d'étudier en temps réel la migration des ASC vers le sphéroïde de MSC-G non marquées et d'observer si un transfert mitochondrial a eu lieu et au bout de quelle durée.</p> <p>- Récupérer les MSC-G ayant internalisé les mitochondries via cytométrie en flux par exemple en sélectionnant les cellules mitochondries + / actine - et effectuer un « RNA-seq » pour analyser l'évolution de leur transcriptome et les répercussions sur leur phénotype et leurs capacités de différenciation.</p> <p>- Tester des sondes quantum dots marquant le noyau des MSC-G pour pouvoir les identifier et les isoler de manière plus fiable tout en vérifiant si ce marquage offre un compromis acceptable entre l'autofluorescence observée des sphéroïdes et la détection des ASC ayant migré au sein de ces derniers.</p> <p>- Observation de la distribution des mitochondries au sein des ASC pour obtenir des indices sur leur différenciation cellulaire (localisation péri-nucléaire ou répartition uniforme dans la cellule ; rapport surface mitochondriale/surface cytoplasmique).</p>	<p>- Etudier de manière spécifique, à l'échelle cellulaire et moléculaire, l'interaction entre les ASC et les MSC-G (objectivée par le transfert mitochondrial) dans le but de décrypter le mécanisme d'action impliqué dans la régénération parodontale.</p>

	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Tester des sphéroïdes formés avec des MSC-G provenant de gencives inflammatoires.</li> <li>- Mise en œuvre de la spectroscopie Raman associée aux approches de « machine learning » pour étudier la différenciation cellulaire des MSC-G au sein du modèle et réaliser des mises au point sur ce dernier afin d'ouvrir la voie dans l'avenir à une potentielle exploration de l'explant gingival dans les différents modèles présentés.</li> </ul>	
<b>Modèle ex vivo d'explant gingival au sein du biohybride d'ASC</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Etudier en temps réel la viabilité cellulaire, la cinétique de migration et d'infiltration des ASC marquées au sein de l'explant gingival.</li> <li>- Utiliser des marquages cytoplasmiques de type quantum dots et analyser au cours du temps la morphologie et le comportement des ASC ayant migré au sein de l'explant gingival.</li> <li>- Tenter également de marquer les mitochondries des ASC pour observer si des transferts interviennent avec les cellules endogènes de l'explant.</li> <li>- Tester des explants gingivaux provenant de gencives inflammatoires.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- S'assurer de retrouver les ASC marquées au sein de l'explant gingival. Dans ce modèle, pas de risque d'écrasement de l'échantillon avec la lame donc pas de problème éventuel lié à la diffusion passive des ASC au sein de la gencive comme cela peut être le cas pour le modèle in toto.</li> <li>- Mise en évidence par imagerie en temps réel d'une interaction entre les ASC et les cellules endogènes de l'explant gingival.</li> </ul>
<b>Modèle in toto « gencive-like »</b>	<p>- <u>Imagerie au MacroSPIM :</u></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Tester si la fluorescence de l'ER-ID Red liée aux ASC observées dans l'hydrogel à t=0h non greffé est maintenue après transparisation.</li> <li>• Renouveler l'expérience en réalisant les 2 conditions n'ayant pu être imagées : gencive sur dentine avec un hydrogel contenant des ASC (ER-ID Red<sup>+</sup>/Hoechst<sup>+</sup>) et des ASC (ER-ID Red<sup>-</sup>/Hoechst<sup>+</sup>), et en ajoutant les contrôles négatifs suivants : montage gencive sur dentine avec hydrogel sans cellules et montage gencive sur dentine sans hydrogel.</li> </ul> <hr/> <p>- <u>Imagerie au microscope confocal :</u></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Imager l'échantillon au temps initial en balayant par exemple les 40 µm de profondeur de toute la gencive ou une bande de celle-ci, ou réaliser un « Z stack » en assemblant les différentes coupes pour obtenir une image 3D, ou bien réaliser une imagerie en mosaïque.</li> <li>• L'expérience ayant été réalisée une fois, la renouveler avec ajout du contrôle négatif suivant : biohybride d'ASC non marquées sur dentine, et en augmentant la cinétique jusqu'à 72h ou 96h post-greffe. Réaliser une condition contrôle supplémentaire en remplaçant les ASC par des fibroblastes (NIH-3T3).</li> <li>• Laisser les ASC marquées à l'ER-ID Red dégorger le marqueur plus longtemps avant de les incorporer au sein de l'hydrogel (plutôt 3 à 5h contre les 30min effectuées).</li> <li>• Imager l'explant gingival selon différentes orientations en le retournant et le visualisant par la face conjonctive (côté greffe) plutôt que par la face épithéliale.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Visualiser la migration des ASC contenues dans l'hydrogel vers la gencive.</li> </ul> <hr/> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Observer d'autres plans focaux afin de vérifier si ce signal fluorescent rouge est également retrouvé à t=0h.</li> <li>- Montrer que le résultat observé pour les ASC est bien spécifique et ne dépend pas d'une migration « passive » de ces dernières au sein de la gencive.</li> <li>- Tenter d'éviter l'artefact obtenu à t=0h, qui pourrait être dû au relargage du marqueur par les cellules présentes dans l'hydrogel.</li> <li>- Pénétrer plus facilement en profondeur dans l'échantillon.</li> </ul>

	<p>- Tester la microscopie par génération de seconde harmonique (SHG).</p> <hr/> <p>- A la fin de l'expérience, fixer l'échantillon et effectuer une incision au centre du complexe tissulaire pour l'imager avec un microscope biphotonique droit. La gencive étant ainsi séparée en 2 morceaux, une partie sera ensuite utilisée pour réaliser de l'immunofluorescence en 2D tandis que l'autre partie sera imagée au MacroSPIM (+/- transparisation).</p> <hr/> <p>- Reproduire l'expérience en lésant initialement la gencive.</p> <hr/> <p>- Réaliser l'expérience sur gencive inflammatoire afin d'inclure les composantes immuno-inflammatoires du microenvironnement relatif à la maladie parodontale.</p> <hr/> <p>- Réaliser des analyses immunohistologiques à partir de marqueurs de différenciation cellulaire tels que l'ostéocalcine, Cbfa-1, la sialoprotéine osseuse (BSP), l'ostéopontine et <math>\alpha</math>-SMA, et visualiser la co-localisation entre ces différents marquages et le signal fluorescent rouge des ASC.</p> <p>- Récupérer les ASC marquées par cytométrie en flux afin d'analyser, notamment par des techniques de PCR, l'expression de différents gènes étroitement liés au potentiel thérapeutique des MSC, à savoir ceux relatifs à la différenciation cellulaire comme abordé précédemment, à la pluripotence cellulaire (Oct-3, Oct-4, Nanog, Sox2, SSEA-3, SSEA-4), aux propriétés pro ou anti-inflammatoires (TNF-<math>\alpha</math>, IFN-<math>\gamma</math>, IL-1<math>\beta</math>, IL-6, IL-10, IDO, PGE2), ainsi qu'à leur potentiel pro-angiogénique (VEGF) et à l'apoptose (caspase 3).</p> <hr/> <p>- Après récupération des ASC marquées par cytométrie en flux, réaliser un « RNA-seq ».</p> <hr/> <p>- Récupérer l'explant gingival et tester la technique du « single-cell RNA-seq » pour obtenir, entre autres, des informations précises sur le phénotype des MSC-G. Analyser en parallèle le profil des cellules immunitaires en pré- et post-greffe (évolution du ratio de macrophages M1/M2, du ratio de macrophages CD68+ connus pour être associés à la rupture du collagène et à la sévérité de la parodontite, suivi du ratio lymphocytes Th17/Treg, quantification de la proportion de lymphocytes B exprimant le ligand RANKL).</p>	<p>- Objectiver plus aisément la différence de structure entre le biohybride (sans collagène) et la gencive (avec collagène) du dispositif.</p> <hr/> <p>- Rationaliser l'exploration des échantillons.</p> <hr/> <p>- Vérifier si les ASC sont attirées sur le site lésé.</p> <hr/> <p>- Inclure les composantes immuno-inflammatoires du microenvironnement relatif à la maladie parodontale.</p> <hr/> <p>- Bien que ces expériences ne nous permettent pas de définir le phénotype précis des cellules observées, elles nous fourniront des informations précieuses sur le mécanisme potentiel mis en jeu par les ASC au cours du processus de régénération parodontale, à savoir un effet direct (régénération due essentiellement à la différenciation des ASC exogènes greffées) ou indirect (régénération majoritairement due à la stimulation des progéniteurs endogènes).</p> <hr/> <p>- Déterminer de manière fiable le phénotype des ASC récoltées.</p> <hr/> <p>- Offre la possibilité d'étudier précisément l'ensemble des populations cellulaires présentes au sein de l'explant gingival dont les MSC-G, en évaluant le transcriptome de chaque cellule composant un échantillon.</p> <hr/> <p>- Contrôler si la greffe d'ASC est susceptible de faire évoluer les effecteurs de l'immunité vers des phénotypes régulateurs plutôt que pro-inflammatoires.</p>
--	---	--

## Conclusion

Au cours de ce travail, nous avons identifié une sonde fluorescente fiable, l'ER-ID, destinée au suivi des ASC au sein des différents modèles 3D de greffe. Ainsi, nous avons mis au point trois modèles 3D du parodonte :

- ✚ Des sphéroïdes de progéniteurs gingivaux
- ✚ Des sphéroïdes de fraction stromale vasculaire de gencive
- ✚ Un modèle utilisant un greffon de gencive sur tranche de dentine (modèle *in toto*)

Enfin, nous avons déterminé les conditions d'imagerie et d'analyse du modèle *in toto*. Des optimisations supplémentaires, associées à la réalisation des expériences suggérées, permettront d'approfondir l'étude des interactions ASC/progéniteurs gingivaux et autres cellules gingivales, notamment par l'exploration du premier modèle de greffe (sphéroïdes de SVF parodontale ou de MSC-G en hLP d'ASC) et du troisième modèle de greffe (explant gingival en hLP d'ASC). Les modèles présentés s'avèrent ainsi très prometteurs pour décrypter les mécanismes d'action mis en jeu par les ASC dans le cadre de la régénération parodontale, et rendent possible l'étude des interactions ASC/cellules immunitaires afin d'acquérir une compréhension globale de la thérapie cellulaire parodontale par ASC via la prise en compte des notions d'immunomodulation, de rééducation du microenvironnement, et de retour à l'homéostasie tissulaire. Ces modèles *ex vivo* pertinents serviront de preuve de concept et ouvriront ainsi de nouvelles perspectives pour l'évaluation des stratégies de régénération du parodonte, en réduisant le nombre d'animaux requis aux tests *in vivo*, et en garantissant les fondements d'une translation fiable et raisonnée en clinique humaine.

**Vu le président du jury**

Pr Philippe Kemoun



**Vu le directeur de thèse**

Dr Paul Monsarrat



## LISTE DES FIGURES

<b>Figure 1</b> : Tissus formant le parodonte ; source : Bouchard et al. (2).....	16
<b>Figure 2</b> : Coupe histologique de molaire mandibulaire indiquant la localisation des ciments cellulaire et acellulaire ; source : Moss-Salentijn et al. (9).....	17
<b>Figure 3</b> : Fibres principales du desmodonte avec leurs extrémités (fibres de Sharpey) ancrées au sein du ciment et de l'os alvéolaire ; source : Zwetchkenbaum et al. (11).....	18
<b>Figure 4</b> : Différents scénarios à l'origine de la cicatrisation parodontale ; source : Rose et al. (15)...	20
<b>Figure 5</b> : Dysbiose microbienne et prédisposition de l'hôte à la réaction inflammatoire contribuent au développement de la parodontite ; d'après Hajishengallis et al. (22) et Ren et al. (23).....	21
<b>Figure 6</b> : Schéma récapitulatif des réponses immunitaires innée et acquise mises en jeu lors du processus de parodontite ; source : Muñoz-Carrillo et al. (4).....	23
<b>Figure 7</b> : Arbre décisionnel relatif au traitement de la parodontite ; source : Kwon et al. (17).....	25
<b>Figure 8</b> : Schéma récapitulatif des thérapeutiques régénératives parodontales ; source : Mancini et al. (18).....	27
<b>Figure 9</b> : Potentiel thérapeutique des MSC ; source : Fan et al. (44).....	28
<b>Figure 10</b> : Effets immunosuppresseurs des MSC ; source : Müller et al. (47).....	29
<b>Figure 11</b> : Adaptation des effets immunomodulateurs des MSC en réponse au contexte inflammatoire local pour assurer le maintien de l'homéostasie tissulaire ; source : Zhou et al. (48)...	30
<b>Figure 12</b> : Principaux types de cellules souches mésenchymateuses « odontogènes » ; source : Wang et al. (26).....	32
<b>Figure 13</b> : Schéma représentatif de la constitution de biohybride d'ASC humaines.....	43
<b>Figure 14</b> : Schéma représentant la constitution du modèle <i>in vitro</i> .....	44
<b>Figure 15</b> : Schéma représentatif de la constitution du modèle <i>ex vivo</i> « gencive-like » vu de profil <b>(1)</b> et un aperçu du modèle cultivé en boîte de pétri vu de profil <b>(2)</b> et vu du dessus <b>(3)</b> .....	45
<b>Figure 16</b> : Aperçu du champ d'acquisition au vidéo-microscope des cellules ASC et MSC marquées ou non.....	47
<b>Figure 17</b> : Caractérisation au SPIM de biohybrides contenant des ASC marquées.....	50
<b>Figure 18</b> : Caractérisation au MacroSPIM de biohybrides sans ASC ou contenant des ASC marquées.....	51
<b>Figure 19</b> : Sphéroïdes de SVF gingivale cultivés en milieu $\alpha$ MEM complet (2% LP, 1% ASP).....	52

<b>Figure 20</b> : Sphéroïdes de SVF gingivale cultivés en milieu $\alpha$ MEM complet (2% LP, 1% ASP) ou EGM2 après lyse des globules rouges.....	52
<b>Figure 21</b> : Sphéroïdes de MSC gingivales en P1, cultivés en milieu $\alpha$ MEM complet (2% LP, 1% ASP) ou en milieu EGM2 1% ASP.....	53
<b>Figure 22</b> : Caractérisation au MacroSPIM de greffes de biohybrides contenant des ASC dans des cultures de gencive sur dentine.....	54
<b>Figure 23</b> : Caractérisation au microscope confocal de greffes de biohybrides contenant des ASC dans des cultures de gencive sur dentine.....	56
<b>Figure 24</b> : MacroSPIM. MacroSPIM <b>(A)</b> vu de dessus <b>(B)</b> vu sur le côté <b>(C)</b> schématisé.....	91

## LISTE DES TABLEAUX

- Tableau 1** : Etude du devenir des MSC transplantées au sein des modèles animaux précliniques et de leur contribution au processus de régénération parodontale..... 36-38
- Tableau 2** : Principales caractéristiques des différents modèles..... 65
- Tableau 3** : Tableau récapitulatif des expérimentations à mener et de leurs objectifs dans le cadre des différentes phases de notre projet..... 66-69

## BIBLIOGRAPHIE

1. Matichescu A, Ardelean LC, Rusu LC, Craciun D, Bratu EA, Babucea M, et al. Advanced Biomaterials and Techniques for Oral Tissue Engineering and Regeneration—A Review. *Materials*. 23 nov 2020;13(22):5303.
2. Bouchard P. Parodontologie & dentisterie implantaire. Vol. 1 - Médecine parodontale, Lavoisier-Médecine sciences; 2014. 9-38 p.
3. Bosshardt DD. The periodontal pocket: pathogenesis, histopathology and consequences. *Periodontol 2000*. févr 2018;76(1):43-50.
4. Luis Muñoz-Carrillo J, Elizabeth Hernández-Reyes V, Eduardo García-Huerta O, Chávez-Ruvalcaba F, Isabel Chávez-Ruvalcaba M, Mariana Chávez-Ruvalcaba K, et al. Pathogenesis of Periodontal Disease. In: Mohammed Ahmed Yussif N, éditeur. *Periodontal Disease - Diagnostic and Adjunctive Non-surgical Considerations* [Internet]. IntechOpen; 2020 [cité 28 mai 2022]. Disponible sur: <https://www.intechopen.com/books/periodontal-disease-diagnostic-and-adjunctive-non-surgical-considerations/pathogenesis-of-periodontal-disease>
5. Arzate H, Zeichner-David M, Mercado-Celis G. Cementum proteins: role in cementogenesis, biomineralization, periodontium formation and regeneration. *Periodontol 2000*. févr 2015;67(1):211-33.
6. Kémoun P, Laurencin-Dalieux S, Rue J, Farges JC, Gennero I, Conte-Auriol F, et al. Human dental follicle cells acquire cementoblast features under stimulation by BMP-2/-7 and enamel matrix derivatives (EMD) in vitro. *Cell Tissue Res*. 30 juin 2007;329(2):283-94.
7. Liu J, Ruan J, Weir MD, Ren K, Schneider A, Wang P, et al. Periodontal Bone-Ligament-Cementum Regeneration via Scaffolds and Stem Cells. *Cells*. 4 juin 2019;8(6):537.
8. Yamamoto T, Hasegawa T, Yamamoto T, Hongo H, Amizuka N. Histology of human cementum: Its structure, function, and development. *Japanese Dental Science Review*. août 2016;52(3):63-74.
9. Moss-Salentijn L, Applebaum E, Lammé AT. *Orofacial histology and embryology: a visual integration*. F. A. Davis; 1972. 75 p.
10. Liang Y, Luan X, Liu X. Recent advances in periodontal regeneration: A biomaterial perspective. *Bioactive Materials*. juin 2020;5(2):297-308.
11. Zwetchkenbaum S, Taichman LS. *Clinical Men's Health*. In: Chapter 14 - Oral Health\*. Elsevier; 2008. p. 243-62.
12. de Jong T, Bakker AD, Everts V, Smit TH. The intricate anatomy of the periodontal ligament and its development: Lessons for periodontal regeneration. *J Periodont Res*. déc 2017;52(6):965-74.
13. Buduneli N. Biomarkers in Periodontal Health and Disease: Rationale, Benefits, and Future Directions [Internet]. Cham: Springer International Publishing; 2020 [cité 20 oct 2021]. Disponible sur: <http://link.springer.com/10.1007/978-3-030-37317-7>
14. A S, Tanwar E, N S, Bhat D, A S. Alveolar bone in health. *IP International Journal of Periodontology and Implantology*. 15 févr 2021;2(4):112-6.

15. Rose LF, Mealey, Brian L. Periodontics: medicine, surgery, and implants. Elsevier Mosby; 2004. 1716 p.
16. Bourgeois D, Bouchard P, Mattout C. Epidemiology of periodontal status in dentate adults in France, 2002–2003. *Journal of Periodontal Research*. 2007;42(3):219-27.
17. Kwon T, Lamster IB, Levin L. Current Concepts in the Management of Periodontitis. *International Dental Journal*. déc 2021;71(6):462-76.
18. Mancini L, Fratini A, Marchetti E. Periodontal Regeneration. *Encyclopedia*. mars 2021;1(1):87-98.
19. Monsarrat P, Blaizot A, Kémoun P, Ravaud P, Nabet C, Sixou M, et al. Clinical research activity in periodontal medicine: a systematic mapping of trial registers. *J Clin Periodontol*. mai 2016;43(5):390-400.
20. Hajishengallis G, Korostoff JM. Revisiting the Page & Schroeder model: the good, the bad and the unknowns in the periodontal host response 40 years later. *Periodontol 2000*. oct 2017;75(1):116-51.
21. Nanci A, Bosshardt DD. Structure of periodontal tissues in health and disease\*. *Periodontol 2000*. févr 2006;40(1):11-28.
22. Hajishengallis G. Periodontitis: from microbial immune subversion to systemic inflammation. *Nat Rev Immunol*. janv 2015;15(1):30-44.
23. Ren H, Du M. Role of Maternal Periodontitis in Preterm Birth. *Front Immunol*. 13 févr 2017;8.
24. Becerra-Ruiz JS, Guerrero-Velázquez C, Martínez-Esquivias F, Martínez-Pérez LA, Guzmán-Flores JM. Innate and adaptive immunity of periodontal disease. From etiology to alveolar bone loss. *Oral Diseases*. 28 avr 2021;odi.13884.
25. Könönen E, Gursoy M, Gursoy U. Periodontitis: A Multifaceted Disease of Tooth-Supporting Tissues. *JCM*. 31 juill 2019;8(8):1135.
26. Wang M, Xie J, Wang C, Zhong D, Xie L, Fang H. Immunomodulatory Properties of Stem Cells in Periodontitis: Current Status and Future Prospective. *Stem Cells International*. 8 juill 2020;2020:1-14.
27. Kourtzelis I, Hajishengallis G, Chavakis T. Phagocytosis of Apoptotic Cells in Resolution of Inflammation. *Front Immunol*. 31 mars 2020;11:553.
28. Doran AC, Yurdagul A, Tabas I. Efferocytosis in health and disease. *Nat Rev Immunol*. avr 2020;20(4):254-67.
29. Pilipchuk SP, Plonka AB, Monje A, Taut AD, Lanis A, Kang B, et al. Tissue engineering for bone regeneration and osseointegration in the oral cavity. *Dental Materials*. avr 2015;31(4):317-38.
30. Sam G. Evolution of Barrier Membranes in Periodontal Regeneration-“Are the third Generation Membranes really here?”. *JCDR [Internet]*. 2014 [cité 28 mai 2022]; Disponible sur: [http://www.jcdr.net/article\\_fulltext.asp?issn=0973-709x&year=2014&volume=8&issue=12&page=ZE14&issn=0973-709x&id=5272](http://www.jcdr.net/article_fulltext.asp?issn=0973-709x&year=2014&volume=8&issue=12&page=ZE14&issn=0973-709x&id=5272)

31. Khoshkam V, Chan HL, Lin GH, Mailoa J, Giannobile WV, Wang HL, et al. Outcomes of regenerative treatment with rhPDGF-BB and rhFGF-2 for periodontal intra-bony defects: a systematic review and meta-analysis. *J Clin Periodontol.* mars 2015;42(3):272-80.
32. Hoffmann T, Al-Machot E, Meyle J, Jervøe-Storm PM, Jepsen S. Three-year results following regenerative periodontal surgery of advanced intrabony defects with enamel matrix derivative alone or combined with a synthetic bone graft. *Clin Oral Invest.* mars 2016;20(2):357-64.
33. Lee HS, Byun SH, Cho SW, Yang BE. Past, Present, and Future of Regeneration Therapy in Oral and Periodontal Tissue: A Review. *Applied Sciences.* 13 mars 2019;9(6):1046.
34. Fukuba S, Okada M, Nohara K, Iwata T. Alloplastic Bone Substitutes for Periodontal and Bone Regeneration in Dentistry: Current Status and Prospects. *Materials.* 26 févr 2021;14(5):1096.
35. Hägi TT, Laugisch O, Ivanovic A, Sculean A. Regenerative periodontal therapy. *Quintessence International.* 24 janv 2014;45(3):185-92.
36. Galli M, Yao Y, Giannobile WV, Wang HL. Current and future trends in periodontal tissue engineering and bone regeneration. *PAR [Internet].* 8 janv 2021 [cité 19 oct 2021];2021. Disponible sur: <https://parjournal.net/article/view/3864>
37. Kémoun P, Gronthos S, Snead ML, Rue J, Courtois B, Vaysse F, et al. The role of cell surface markers and enamel matrix derivatives on human periodontal ligament mesenchymal progenitor responses in vitro. *Biomaterials.* oct 2011;32(30):7375-88.
38. Grandin HM, Gemperli AC, Dard M. Enamel Matrix Derivative: A Review of Cellular Effects *In Vitro* and a Model of Molecular Arrangement and Functioning. *Tissue Engineering Part B: Reviews.* juin 2012;18(3):181-202.
39. Stavropoulos A, Bertl K, Spineli LM, Sculean A, Cortellini P, Tonetti M. Medium- and long-term clinical benefits of periodontal regenerative/reconstructive procedures in intrabony defects: Systematic review and network meta-analysis of randomized controlled clinical studies. *J Clin Periodontology.* mars 2021;48(3):410-30.
40. Nibali L, Sultan D, Arena C, Pelekos G, Lin G, Tonetti M. Periodontal infrabony defects: Systematic review of healing by defect morphology following regenerative surgery. *J Clin Periodontol.* janv 2021;48(1):101-14.
41. Citterio F, Gualini G, Fierravanti L, Aimetti M. Stem cells and periodontal regeneration: present and future. *PAR [Internet].* 15 août 2020 [cité 28 mai 2022];2020. Disponible sur: <https://parjournal.net/article/view/3602>
42. Shang L, Shao J, Ge S. Immunomodulatory functions of oral mesenchymal stem cells: Novel force for tissue regeneration and disease therapy. *J Leukoc Biol.* sept 2021;110(3):539-52.
43. Wang M, Yuan Q, Xie L. Mesenchymal Stem Cell-Based Immunomodulation: Properties and Clinical Application. *Stem Cells International.* 14 juin 2018;2018:1-12.
44. Fan XL, Zhang Y, Li X, Fu QL. Mechanisms underlying the protective effects of mesenchymal stem cell-based therapy. *Cell Mol Life Sci.* juill 2020;77(14):2771-94.

45. Gu F, Zhang K, Li J, Xie X, Wen Q, Sui Z, et al. Changes of Migration, Immunoregulation and Osteogenic Differentiation of Mesenchymal Stem Cells in Different Stages of Inflammation. *Int J Med Sci.* 2022;19(1):25-33.
46. Daneshmandi L, Shah S, Jafari T, Bhattacharjee M, Momah D, Saveh-Shemshaki N, et al. Emergence of the Stem Cell Secretome in Regenerative Engineering. *Trends in Biotechnology.* déc 2020;38(12):1373-84.
47. Müller L, Tunger A, Wobus M, von Bonin M, Towers R, Bornhäuser M, et al. Immunomodulatory Properties of Mesenchymal Stromal Cells: An Update. *Front Cell Dev Biol.* 9 févr 2021;9:637725.
48. Zhou L li, Liu W, Wu Y min, Sun W lian, Dörfer CE, Fawzy El-Sayed KM. Oral Mesenchymal Stem/Progenitor Cells: The Immunomodulatory Masters. *Stem Cells International.* 25 févr 2020;2020:1-16.
49. Jiang W, Xu J. Immune modulation by mesenchymal stem cells. *Cell Prolif* [Internet]. janv 2020 [cité 28 mai 2022];53(1). Disponible sur: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/cpr.12712>
50. Zhou X, Hong Y, Zhang H, Li X. Mesenchymal Stem Cell Senescence and Rejuvenation: Current Status and Challenges. *Front Cell Dev Biol.* 3 juin 2020;8:364.
51. Zhang Y, Ravikumar M, Ling L, Nurcombe V, Cool SM. Age-Related Changes in the Inflammatory Status of Human Mesenchymal Stem Cells: Implications for Cell Therapy. *Stem Cell Reports.* avr 2021;16(4):694-707.
52. Zhu X, Chen Z, Shen W, Huang G, Sedivy JM, Wang H, et al. Inflammation, epigenetics, and metabolism converge to cell senescence and ageing: the regulation and intervention. *Sig Transduct Target Ther.* déc 2021;6(1):245.
53. Aquino-Martinez R, Eckhardt BA, Rowsey JL, Fraser DG, Khosla S, Farr JN, et al. Senescent cells exacerbate chronic inflammation and contribute to periodontal disease progression in old mice. *Journal of Periodontology.* oct 2021;92(10):1483-95.
54. Monsarrat P, Vergnes JN, Nabet C, Sixou M, Snead ML, Planat-Bénard V, et al. Concise Review: Mesenchymal Stromal Cells Used for Periodontal Regeneration: A Systematic Review. *Stem Cells Translational Medicine.* 1 juin 2014;3(6):768-74.
55. Soudi A, Yazdanian M, Ranjbar R, Tebyanian H, Yazdanian A, Tahmasebi E, et al. Role and application of stem cells in dental regeneration: A comprehensive overview. *EXCLI Journal*; 20:Doc454; ISSN 1611-2156 [Internet]. 2021 [cité 28 mai 2022]; Disponible sur: <https://www.excli.de/index.php/excli/article/view/3335>
56. Mazini L, Rochette L, Amine M, Malka G. Regenerative Capacity of Adipose Derived Stem Cells (ADSCs), Comparison with Mesenchymal Stem Cells (MSCs). *IJMS.* 22 mai 2019;20(10):2523.
57. Ceccarelli S, Pontecorvi P, Anastasiadou E, Napoli C, Marchese C. Immunomodulatory Effect of Adipose-Derived Stem Cells: The Cutting Edge of Clinical Application. *Front Cell Dev Biol.* 17 avr 2020;8:236.
58. Desai S, Jayasuriya CT. Implementation of Endogenous and Exogenous Mesenchymal Progenitor Cells for Skeletal Tissue Regeneration and Repair. *Bioengineering.* 4 août 2020;7(3):86.

59. Wang Y, Yi H, Song Y. The safety of MSC therapy over the past 15 years: a meta-analysis. *Stem Cell Res Ther.* déc 2021;12(1):545.
60. Yamada Y, Nakamura-Yamada S, Konoki R, Baba S. Promising advances in clinical trials of dental tissue-derived cell-based regenerative medicine. *Stem Cell Res Ther.* déc 2020;11(1):175.
61. Moreno Sancho F, Leira Y, Orlandi M, Buti J, Giannobile WV, D'Aiuto F. Cell-Based Therapies for Alveolar Bone and Periodontal Regeneration: Concise Review. *Stem Cells Translational Medicine.* 1 déc 2019;8(12):1286-95.
62. Zheng C, Chen J, Liu S, Jin Y. Stem cell-based bone and dental regeneration: a view of microenvironmental modulation. *Int J Oral Sci.* sept 2019;11(3):23.
63. Trofin EA, Monsarrat P, Kémoun P. Cell therapy of periodontium: from animal to human? *Front Physiol* [Internet]. 2013 [cité 28 mai 2022];4. Disponible sur: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fphys.2013.00325/abstract>
64. Seo Y, Shin TH, Kim HS. Current Strategies to Enhance Adipose Stem Cell Function: An Update. *IJMS.* 5 août 2019;20(15):3827.
65. Gaur S, Agnihotri R. Application of Adipose Tissue Stem Cells in Regenerative Dentistry: A Systematic Review. *J Int Soc Prev Community Dent.* juin 2021;11(3):266-71.
66. Tobita M, Uysal CA, Guo X, Hyakusoku H, Mizuno H. Periodontal tissue regeneration by combined implantation of adipose tissue-derived stem cells and platelet-rich plasma in a canine model. *Cytherapy.* déc 2013;15(12):1517-26.
67. Ozasa M, Sawada K, Iwayama T, Yamamoto S, Morimoto C, Okura H, et al. Periodontal tissue regeneration by transplantation of adipose tissue-derived multi-lineage progenitor cells. *Inflammation and Regeneration.* 2014;34(2):109-16.
68. Venkataiah VS, Handa K, Njuguna MM, Hasegawa T, Maruyama K, Nemoto E, et al. Periodontal Regeneration by Allogeneic Transplantation of Adipose Tissue Derived Multi-Lineage Progenitor Stem Cells in vivo. *Sci Rep.* déc 2019;9(1):921.
69. Lemaitre M, Monsarrat P, Blasco-Baque V, Loubières P, Burcelin R, Casteilla L, et al. Periodontal Tissue Regeneration Using Syngeneic Adipose-Derived Stromal Cells in a Mouse Model. *Stem Cells Translational Medicine.* 1 févr 2017;6(2):656-65.
70. Abbo O, Taurand M, Monsarrat P, Raymond I, Arnaud E, De Barros S, et al. Comparison between pediatric and adult adipose mesenchymal stromal cells. *Cytherapy.* mars 2017;19(3):395-407.
71. Monsarrat P, Kémoun P, Casteilla L, Planat-Bénard V. Broad-Spectrum Antibacterial Effects of Human Adipose-Derived Stromal Cells. *Stem Cells International.* 29 oct 2019;2019:1-14.
72. Zeng WY, Ning Y, Huang X. Advanced technologies in periodontal tissue regeneration based on stem cells: Current status and future perspectives. *Journal of Dental Sciences.* janv 2021;16(1):501-7.
73. Baptista L, Kronemberger G, Côrtes I, Charelli L, Matsui R, Palhares T, et al. Adult Stem Cells Spheroids to Optimize Cell Colonization in Scaffolds for Cartilage and Bone Tissue Engineering. *IJMS.* 25 avr 2018;19(5):1285.

74. Gionet-Gonzales MA, Leach JK. Engineering principles for guiding spheroid function in the regeneration of bone, cartilage, and skin. *Biomed Mater*. 21 mars 2018;13(3):034109.
75. Iwasaki K, Peng Y, Kanda R, Umeda M, Ishikawa I. Stem Cell Transplantation and Cell-Free Treatment for Periodontal Regeneration. *IJMS*. 18 janv 2022;23(3):1011.
76. Portron S, Soueidan A, Marsden AC, Rakic M, Verner C, Weiss P, et al. Periodontal regenerative medicine using mesenchymal stem cells and biomaterials: A systematic review of pre-clinical studies. *Dent Mater J*. 26 nov 2019;38(6):867-83.
77. Dubuc A, Planat-Bénard V, Marty M, Monsarrat P, Kémoun P. Periodontal Cell Therapy: A Systematic Review and Meta-analysis. In: Santi-Rocca J, éditeur. *Periodontitis* [Internet]. Cham: Springer International Publishing; 2022 [cité 17 août 2022]. p. 377-97. (*Advances in Experimental Medicine and Biology*; vol. 1373). Disponible sur: [https://link.springer.com/10.1007/978-3-030-96881-6\\_20](https://link.springer.com/10.1007/978-3-030-96881-6_20)
78. Struillou X, Boutigny H, Soueidan A, Layrolle P. Experimental Animal Models in Periodontology: A Review. *TODENTJ*. 29 avr 2010;4(1):37-47.
79. Hasegawa N, Kawaguchi H, Hirachi A, Takeda K, Mizuno N, Nishimura M, et al. Behavior of Transplanted Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells in Periodontal Defects. *Journal of Periodontology*. juin 2006;77(6):1003-7.
80. Iwasaki K, Akazawa K, Nagata M, Komaki M, Honda I, Morioka C, et al. The Fate of Transplanted Periodontal Ligament Stem Cells in Surgically Created Periodontal Defects in Rats. *IJMS*. 7 janv 2019;20(1):192.
81. Liu Y, Zheng Y, Ding G, Fang D, Zhang C, Bartold PM, et al. Periodontal Ligament Stem Cell-Mediated Treatment for Periodontitis in Miniature Swine. *Stem Cells*. 1 avr 2008;26(4):1065-73.
82. Menicanin D, Mroziak KM, Wada N, Marino V, Shi S, Bartold PM, et al. Periodontal-Ligament-Derived Stem Cells Exhibit the Capacity for Long-Term Survival, Self-Renewal, and Regeneration of Multiple Tissue Types in Vivo. *Stem Cells and Development*. mai 2014;23(9):1001-11.
83. Tsumanuma Y, Iwata T, Kinoshita A, Washio K, Yoshida T, Yamada A, et al. Allogeneic Transplantation of Periodontal Ligament-Derived Multipotent Mesenchymal Stromal Cell Sheets in Canine Critical-Size Supra-Alveolar Periodontal Defect Model. *BioResearch Open Access*. mai 2016;5(1):22-36.
84. Wei N, Gong P, Liao D, Yang X, Li X, Liu Y, et al. Auto-transplanted mesenchymal stromal cell fate in periodontal tissue of beagle dogs. *Cytotherapy*. juill 2010;12(4):514-21.
85. Yang Y, Rossi FMV, Putnins EE. Periodontal regeneration using engineered bone marrow mesenchymal stromal cells. *Biomaterials*. nov 2010;31(33):8574-82.
86. Yu X, Ge S, Chen S, Xu Q, Zhang J, Guo H, et al. Human Gingiva-Derived Mesenchymal Stromal Cells Contribute to Periodontal Regeneration in Beagle Dogs. *Cells Tissues Organs*. 2013;198(6):428-37.
87. Huisken J, Stainier D.Y.R. Selective plane illumination microscopy techniques in developmental biology. *Development*. 15 juin 2009;136(12):1963-75.

88. Hong S, Lee J, Kim JM, Kim SY, Kim HR, Kim P. 3D cellular visualization of intact mouse tooth using optical clearing without decalcification. *Int J Oral Sci.* sept 2019;11(3):25.
89. Fortunato TM, Beltrami C, Emanuelli C, De Bank PA, Pula G. Platelet lysate gel and endothelial progenitors stimulate microvascular network formation in vitro: tissue engineering implications. *Sci Rep.* juill 2016;6(1):25326.
90. Canceill T. Développement d'un biomatériau naturel, bioactif, dérivé du sang pour la régénération tissulaire [Biotechnologies]. Université Paul Sabatier - Toulouse III, 2021. Français. NNT : 2021TOU30024. tel-03286765;
91. Robinson ST, Douglas AM, Chadid T, Kuo K, Rajabalan A, Li H, et al. A novel platelet lysate hydrogel for endothelial cell and mesenchymal stem cell-directed neovascularization. *Acta Biomaterialia.* mai 2016;36:86-98.
92. Rühland S, Wechselberger A, Spitzweg C, Huss R, Nelson PJ, Harz H. Quantification of in vitro mesenchymal stem cell invasion into tumor spheroids using selective plane illumination microscopy. *J Biomed Opt.* 3 avr 2015;20(04):1.
93. J. Braga Osorio Gomes Salgado A, L. Goncalves Reis R, Jorge Carvalho Sousa N, M. Gimble J, J. Salgado A, L. Reis R, et al. Adipose Tissue Derived Stem Cells Secretome: Soluble Factors and Their Roles in Regenerative Medicine. *CSCR.* 1 juin 2010;5(2):103-10.
94. Shah S, Lee H, Park YH, Jeon E, Chung HK, Lee ES, et al. Three-dimensional Angiogenesis Assay System using Co-culture Spheroids Formed by Endothelial Colony Forming Cells and Mesenchymal Stem Cells. *JoVE.* 18 sept 2019;(151):60032.
95. Shah BS, Clark PA, Moioli EK, Stroschio MA, Mao JJ. Labeling of Mesenchymal Stem Cells by Bioconjugated Quantum Dots. *Nano Lett.* 1 oct 2007;7(10):3071-9.
96. Accomasso L, Gallina C, Turinetto V, Giachino C. Stem Cell Tracking with Nanoparticles for Regenerative Medicine Purposes: An Overview. *Stem Cells International.* 2016;2016:1-23.
97. Cornwell JA, Gutierrez MZ, Harvey RP, Nordon RE. Live cell imaging and single cell tracking of mesenchymal stromal cells *in vitro*. In: Atkinson K, éditeur. *The Biology and Therapeutic Application of Mesenchymal Cells* [Internet]. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc.; 2016 [cité 17 août 2022]. p. 323-46. Disponible sur: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/9781118907474.ch24>
98. Gao J, Xu B. Applications of nanomaterials inside cells. *Nano Today.* févr 2009;4(1):37-51.
99. Zhao MX, Zeng EZ. Application of functional quantum dot nanoparticles as fluorescence probes in cell labeling and tumor diagnostic imaging. *Nanoscale Res Lett.* déc 2015;10(1):171.
100. Wang G, Zeng G, Wang C, Wang H, Yang B, Guan F, et al. Biocompatibility of quantum dots (CdSe/ZnS) in human amniotic membrane-derived mesenchymal stem cells in vitro. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub.* 28 juin 2015;159(2):227-33.
101. Chikate TR, Tang L. Tracking and Imaging of Transplanted Stem Cells in Animals. In: Turksen K, éditeur. *Imaging and Tracking Stem Cells* [Internet]. New York, NY: Springer US; 2019 [cité 17 août 2022]. p. 45-56. (Methods in Molecular Biology; vol. 2150). Disponible sur: [http://link.springer.com/10.1007/7651\\_2019\\_275](http://link.springer.com/10.1007/7651_2019_275)

102. Masterson CH, Curley GF, Laffey JG. Modulating the distribution and fate of exogenously delivered MSCs to enhance therapeutic potential: knowns and unknowns. *ICMx*. juill 2019;7(S1):41.
103. Sarkar MR, Augat P, Shefelbine SJ, Schorlemmer S, Huber-Lang M, Claes L, et al. Bone formation in a long bone defect model using a platelet-rich plasma-loaded collagen scaffold. *Biomaterials*. mars 2006;27(9):1817-23.
104. Tobita M, Uysal AC, Ogawa R, Hyakusoku H, Mizuno H. Periodontal Tissue Regeneration with Adipose-Derived Stem Cells. *Tissue Engineering Part A*. juin 2008;14(6):945-53.
105. Rosso F, Giordano A, Barbarisi M, Barbarisi A. From Cell-ECM interactions to tissue engineering. *J Cell Physiol*. mai 2004;199(2):174-80.
106. Stark R, Grzelak M, Hadfield J. RNA sequencing: the teenage years. *Nat Rev Genet*. nov 2019;20(11):631-56.
107. Yan R, Fan C, Yin Z, Wang T, Chen X. Potential applications of deep learning in single-cell RNA sequencing analysis for cell therapy and regenerative medicine. *Stem Cells*. 1 mai 2021;39(5):511-21.
108. Jovic D, Liang X, Zeng H, Lin L, Xu F, Luo Y. Single-cell RNA sequencing technologies and applications: A brief overview. *Clinical & Translational Med [Internet]*. mars 2022 [cité 17 août 2022];12(3). Disponible sur: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/ctm2.694>
109. Armingol E, Officer A, Harismendy O, Lewis NE. Deciphering cell–cell interactions and communication from gene expression. *Nat Rev Genet*. févr 2021;22(2):71-88.
110. Chen Y, Wang H, Yang Q, Zhao W, Chen Y, Ni Q, et al. Single-cell RNA landscape of the osteoimmunology microenvironment in periodontitis. *Theranostics*. 2022;12(3):1074-96.
111. Qian S jiao, Huang Q ru, Chen R ying, Mo J ji, Zhou L yi, Zhao Y, et al. Single-Cell RNA Sequencing Identifies New Inflammation-Promoting Cell Subsets in Asian Patients With Chronic Periodontitis. *Front Immunol*. 8 sept 2021;12:711337.
112. Hwang B, Lee JH, Bang D. Single-cell RNA sequencing technologies and bioinformatics pipelines. *Exp Mol Med*. août 2018;50(8):1-14.
113. Xu P, Wang M, Song W min, Wang Q, Yuan GC, Sudmant PH, et al. The landscape of human tissue and cell type specific expression and co-regulation of senescence genes. *Mol Neurodegeneration*. déc 2022;17(1):5.
114. Uyar B, Palmer D, Kowald A, Murua Escobar H, Barrantes I, Möller S, et al. Single-cell analyses of aging, inflammation and senescence. *Ageing Research Reviews*. déc 2020;64:101156.
115. Saul D, Kosinsky RL, Atkinson EJ, Doolittle ML, Zhang X, LeBrasseur NK, et al. A new gene set identifies senescent cells and predicts senescence-associated pathways across tissues. *Nat Commun*. 16 août 2022;13(1):4827.
116. Prockop DJ. The exciting prospects of new therapies with mesenchymal stromal cells. *Cytotherapy*. janv 2017;19(1):1-8.

117. Wu X, Jiang J, Gu Z, Zhang J, Chen Y, Liu X. Mesenchymal stromal cell therapies: immunomodulatory properties and clinical progress. *Stem Cell Res Ther.* déc 2020;11(1):345.
118. Torralba D, Baixauli F, Sánchez-Madrid F. Mitochondria Know No Boundaries: Mechanisms and Functions of Intercellular Mitochondrial Transfer. *Front Cell Dev Biol* [Internet]. 28 sept 2016 [cité 18 août 2022];4. Disponible sur: <http://journal.frontiersin.org/Article/10.3389/fcell.2016.00107/abstract>
119. Lv M, Zhang S, Jiang B, Cao S, Dong Y, Cao L, et al. Adipose-derived stem cells regulate metabolic homeostasis and delay aging by promoting mitophagy. *The FASEB Journal* [Internet]. juill 2021 [cité 18 août 2022];35(7). Disponible sur: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1096/fj.202100332R>
120. Yao X, Ma Y, Zhou W, Liao Y, Jiang Z, Lin J, et al. In-cytoplasm mitochondrial transplantation for mesenchymal stem cells engineering and tissue regeneration. *Bioengineering & Transla Med* [Internet]. janv 2022 [cité 18 août 2022];7(1). Disponible sur: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/btm2.10250>
121. Yang F, Zhang Y, Liu S, Xiao J, He Y, Shao Z, et al. Tunneling Nanotube-Mediated Mitochondrial Transfer Rescues Nucleus Pulposus Cells from Mitochondrial Dysfunction and Apoptosis. *Zhao FD, éditeur. Oxidative Medicine and Cellular Longevity.* 4 mars 2022;2022:1-16.
122. Planat-Benard V, Varin A, Casteilla L. MSCs and Inflammatory Cells Crosstalk in Regenerative Medicine: Concerted Actions for Optimized Resolution Driven by Energy Metabolism. *Front Immunol.* 30 avr 2021;12:626755.
123. Luz-Crawford P, Hernandez J, Djouad F, Luque-Campos N, Caicedo A, Carrère-Kremer S, et al. Mesenchymal stem cell repression of Th17 cells is triggered by mitochondrial transfer. *Stem Cell Res Ther.* déc 2019;10(1):232.
124. Paliwal S, Chaudhuri R, Agrawal A, Mohanty S. Regenerative abilities of mesenchymal stem cells through mitochondrial transfer. *J Biomed Sci.* déc 2018;25(1):31.
125. Yan W, Diao S, Fan Z. The role and mechanism of mitochondrial functions and energy metabolism in the function regulation of the mesenchymal stem cells. *Stem Cell Res Ther.* déc 2021;12(1):140.
126. Li Q, Gao Z, Chen Y, Guan MX. The role of mitochondria in osteogenic, adipogenic and chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells. *Protein Cell.* juin 2017;8(6):439-45.
127. Wang J, Qi G, Qu X, Ling X, Zhang Z, Jin Y. Molecular Profiling of Dental Pulp Stem Cells during Cell Differentiation by Surface Enhanced Raman Spectroscopy. *Anal Chem.* 3 mars 2020;92(5):3735-41.
128. Lazarević JJ, Kukolj T, Bugarski D, Lazarević N, Bugarski B, Popović ZV. Probing primary mesenchymal stem cells differentiation status by micro-Raman spectroscopy. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy.* avr 2019;213:384-90.
129. Kim H, Han Y, Suhito IR, Choi Y, Kwon M, Son H, et al. Raman Spectroscopy-Based 3D Analysis of Odontogenic Differentiation of Human Dental Pulp Stem Cell Spheroids. *Anal Chem.* 27 juill 2021;93(29):9995-10004.

130. Geng J, Zhang W, Chen C, Zhang H, Zhou A, Huang Y. Tracking the Differentiation Status of Human Neural Stem Cells through Label-Free Raman Spectroscopy and Machine Learning-Based Analysis. *Anal Chem.* 3 août 2021;93(30):10453-61.
131. Ravera F, Efeoglu E, Byrne HJ. Vibrational Spectroscopy for In Vitro Monitoring Stem Cell Differentiation. *Molecules.* 26 nov 2020;25(23):5554.
132. Lee SI, Ko Y, Park JB. Evaluation of the maintenance of stemness, viability, and differentiation potential of gingiva-derived stem-cell spheroids. *Experimental and Therapeutic Medicine.* mai 2017;13(5):1757-64.
133. Tae J, Lee H, Lee H, Ko Y, Park J. Osteogenic potential of cell spheroids composed of varying ratios of gingiva-derived and bone marrow stem cells using concave microwells. *Exp Ther Med [Internet].* 18 juill 2018 [cité 18 août 2022]; Disponible sur: <http://www.spandidos-publications.com/10.3892/etm.2018.6462>
134. Moritani Y, Usui M, Sano K, Nakazawa K, Hanatani T, Nakatomi M, et al. Spheroid culture enhances osteogenic potential of periodontal ligament mesenchymal stem cells. *J Periodont Res.* oct 2018;53(5):870-82.
135. Yan XZ, van den Beucken J, Yuan C, Jansen J, Yang F. Spheroid formation and stemness preservation of human periodontal ligament cells on chitosan films. *Oral Dis.* sept 2018;24(6):1083-92.
136. Bugueno IM, Batoool F, Keller L, Kuchler-Bopp S, Benkirane-Jessel N, Huck O. *Porphyromonas gingivalis* bypasses epithelial barrier and modulates fibroblastic inflammatory response in an in vitro 3D spheroid model. *Sci Rep.* déc 2018;8(1):14914.
137. Iwasaki K, Nagata M, Akazawa K, Watabe T, Morita I. Changes in characteristics of periodontal ligament stem cells in spheroid culture. *J Periodont Res.* août 2019;54(4):364-73.
138. Zhang S, Buttler-Buecher P, Denecke B, Arana-Chavez VE, Apel C. A comprehensive analysis of human dental pulp cell spheroids in a three-dimensional pellet culture system. *Archives of Oral Biology.* juill 2018;91:1-8.
139. Subbarayan R, Murugan Girija D, Ranga Rao S. Gingival spheroids possess multilineage differentiation potential. *J Cell Physiol.* mars 2018;233(3):1952-8.

## **ANNEXES**

**Annexe 1 : Tableau de synthèse illustrant les dérégulations des effecteurs de l'immunité innée et acquise lors de la parodontite par comparaison au parodonte sain.**

	Parodonte sain	Parodontite
Polynucléaires neutrophiles	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 1ères cellules de défense présentes au sein du sulcus.</li> <li>- Recrutement coordonné et finement régulé ; le maintien d'un nombre adapté (neurostat) est essentiel à l'homéostasie des tissus parodontaux.</li> <li>- Neutrophiles para-inflammatoires faisant face au biofilm oral sans être pleinement activés afin d'éviter ainsi des dommages tissulaires.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Neutrophiles pro-inflammatoires : capacités de dégranulation, de phagocytose et de production d'espèces réactives de l'oxygène augmentées.</li> <li>- Surnuméraires, à longue durée de vie, hyperactifs (sécrétion massive de cytokines pro-inflammatoires) ou dérégulés.</li> <li>- Propriétés chimiotactiques altérées</li> <li>- Ce phénotype hyper-inflammatoire persiste même après une thérapie parodontale à succès.</li> <li>- Les polynucléaires neutrophiles sanguins de patients atteints de parodontite chronique relarguent une quantité importante d'espèces réactives de l'oxygène même en l'absence de stimulation exogène, et cela n'est pas corrigé malgré un traitement parodontal concluant d'un point de vue clinique.</li> </ul>
Système du complément	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Élément central de la surveillance immunitaire et de l'homéostasie tissulaire, constituant un lien incontournable entre l'immunité innée et acquise.</li> <li>- Les composants du complément et leurs produits de clivage sont retrouvés à des niveaux très faibles.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Présence importante de produits de clivage du complément au sein du fluide gingival.</li> <li>- Potentiel rôle destructeur : le complément est exploité par le microbiote dysbiotique qui acquiert la capacité d'inhiber les facultés d'opsonisation du complément ainsi que de neutraliser les inhibiteurs physiologiques de ce dernier. Le microbiote dysbiotique est donc en partie protégé contre la phagocytose médiée par le complément et participe également au maintien de l'activation de celui-ci.</li> <li>- L'inflammation dépendante de la fraction C3 est essentielle pour le maintien à long-terme du microbiote dysbiotique et pour l'induction de la résorption osseuse alvéolaire (C3 = cible d'intérêt).</li> <li>- La résolution de l'inflammation parodontale, chez les patients atteints de parodontite chronique traités avec succès, est associée à une réduction de l'activation du complément.</li> </ul>
Macrophages	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Rôle central dans la résolution de l'inflammation ; peu présents dans les tissus sains.</li> <li>- Propriétés de phagocytose des pathogènes et d'efferocytose des cellules apoptotiques.</li> <li>- L'Efferocytose efficace des cellules apoptotiques permet d'éviter l'inflammation excessive et les nécroses secondaires mais entraîne aussi la reprogrammation du profil transcriptionnel des macrophages afin de réduire l'expression de cytokines pro-inflammatoires et d'augmenter l'expression des cytokines régulatrices telles que TGF-<math>\beta</math> et IL-10. Cette plasticité cellulaire est essentielle à la résolution de l'inflammation.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Abondance de macrophages CD68+ corrélés positivement à la rupture du collagène et à la sévérité de la parodontite. Ils sécrètent l'IL-23 qui favorise la prolifération des lymphocytes Th17 conduisant à l'entretien de la réponse inflammatoire.</li> <li>- P.gingivalis détourne la voie de signalisation dépendante des TLR2 au sein des macrophages afin d'échapper à la phagocytose, tout en maintenant une réponse inflammatoire essentielle à l'apport nutritif du microbiote dysbiotique. P.gingivalis manipule ainsi les macrophages afin d'assurer sa survie.</li> <li>- Une conversion phénotypique des macrophages de type M2 vers M1 contribuerait à la maladie.</li> <li>- Efferocytose dérégulée/réduite : accumulation de cellules mortes entraînant une nécrose secondaire des tissus, un maintien de la réponse inflammatoire, avec risque potentiel de réactions auto-immunes, ainsi qu'un défaut d'activation du phénotype pro-résolutif de l'inflammation au sein des macrophages.</li> <li>- La machinerie relative à l'efferocytose peut être usurpée par divers pathogènes pour entraîner l'infection directe des macrophages. Ces pathogènes peuvent également échapper à l'efferocytose en empêchant la lyse des cellules apoptotiques infectées via l'induction de signaux type « don't eat me » d'où nécrose des phagocytes et relargage de bactéries viables participant à la diffusion de l'infection.</li> </ul>
Lymphocytes T	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Présence majoritaire de LT auxiliaires CD4+, LT cytotoxiques CD8+ et petite population de LT <math>\gamma\delta</math>, impliqués dans la surveillance immune locale et l'homéostasie tissulaire.</li> <li>- Suite à l'activation par les cellules présentatrices d'antigènes, les LT naïfs CD4+ peuvent se différencier en LT spécifiques : Th1 / Th2 / Th17 / Treg selon les cytokines présentes dans le microenvironnement local.</li> <li>- Les Treg jouent un rôle régulateur clé dans le maintien de la tolérance au soi et s'opposent aux réponses inflammatoires excessives en réduisant les fonctions de Th1, Th2 et Th17.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Les rôles des Th1 et Th2 ne sont pas clairement définis, entraînant à la fois des réponses protectrices et destructrices. Un modèle intéressant suggère que les Th1 seraient prédominants au sein des lésions précoces stables, tandis que les Th2 seraient associés à la progression de la maladie (lésions avancées) et à la présence d'un infiltrat inflammatoire riche en LB et plasmocytes.</li> <li>- L'activation massive des Th17 favorise les réponses immunitaires médiées par les LB, et entraîne des réactions inflammatoires et/ou auto-immunes, notamment à l'origine de la perte osseuse alvéolaire.</li> <li>- La persistance des Th17 sur le site inflammatoire participe à l'entretien des voies de signalisation médiées par l'IL-17, pouvant ainsi conduire une réponse inflammatoire aiguë vers la chronicité.</li> <li>- La rupture de l'équilibre entre Th17 et Treg, en faveur de Th17, serait un paramètre important dans la pathogénèse de la parodontite. De plus, les lymphocytes Treg peuvent perdre leurs fonctions immunosuppressives au sein d'un environnement inflammatoire, suggérant qu'une augmentation de leur nombre ne sera pas nécessairement liée au contrôle de l'inflammation. D'autre part, il semblerait que des lymphocytes Treg puissent être convertis en Th17 au sein des lésions parodontales humaines.</li> </ul>
Lymphocytes B, Plasmocytes	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Peu présents dans les tissus sains.</li> <li>- Des lymphocytes B « mémoires » sont retrouvés à proximité de l'épithélium jonctionnel et pourraient contribuer au maintien de l'homéostasie gingivale.</li> <li>- Très faible proportion de lymphocytes B exprimant RANKL.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Cellules prédominantes au sein des lésions parodontales ; plus de 90% des LB expriment RANKL.</li> <li>- Augmentation significative du nombre de cellules exprimant la chimiokine CXCL13 au sein des parodontites, favorisant ainsi le recrutement et la diffusion des LB au niveau des tissus atteints.</li> <li>- La production d'IL-4/IL-5/IL-6, d'APRIL et BlyS, cytokines impliquées dans la différenciation des LB en plasmocytes, est majorée chez les patients atteints de parodontite, pouvant ainsi participer au maintien et à la prédominance des LB et plasmocytes au sein des lésions parodontales.</li> <li>- Les niveaux d'Ac sont plus élevés chez les sujets atteints de parodontite, et curieusement, cela ne semble pas améliorer l'évolution de la pathologie. Les réponses induites par les Ac aux bactéries parodontales, chez les patients atteints de parodontite, seraient de faible affinité et présenteraient des capacités d'opsono-phagocytose réduites. En réalité, ce sont les individus avec les niveaux d'Ac les plus importants qui ont tendance à montrer une perte osseuse alvéolaire sévère.</li> <li>- Les IgG ont la capacité d'amplifier les réactions inflammatoires et la dégradation tissulaire notamment via l'activation du système du complément ainsi que des récepteurs au fragment constant présents sur les phagocytes. A ce titre, la parodontite est associée à une augmentation de dépôt de complexes immuns relatifs aux IgG et à la présence de fragments issus de l'activation du complément.</li> </ul>

**Annexe 2 : Tableau illustrant les thérapies basées sur l'utilisation des ASC dans diverses pathologies et les mécanismes cellulaires et moléculaires associés *in vivo* ; source : Ceccarelli et al. (57).**

Pathology	ASCs-based treatment	Cellular and molecular mechanisms	References
Acute Myocardial Infarction	ASCs conditioned medium ASCs exosomes	Pro-survival and anti-apoptotic effects on cardiomyocytes; anti-inflammatory and pro-angiogenic potential (VEGF, HGF, PGF, PGE-2, FGF-2, TGF- $\beta$ , IL-10, IDO, NO, Ang-1 and Ang-2, IGF-1, miR-31, miR-126 and miR-301a); Inhibition of fibrosis and cardiac remodeling (VEGF, HGF, MCP-1, TIMP-1 and TIMP-4)	Valina et al., 2007; Hashemi et al., 2008; Cai et al., 2009; Bai et al., 2010; Grimaldi et al., 2013; Naaijkens et al., 2014; Sommese et al., 2017
Cardiovascular diseases (e.g. acute ischemic stroke)	ASCs (intra-arterial and intravenous transplantation) ASCs exosomes	Attenuated inflammation and enhanced endogenous neurogenesis; reduction in cell death, increase in cellular proliferation, neurogenesis, oligodendrogenesis, synaptogenesis and angiogenesis markers; suppression of inflammation, generation of ROS and oxidative stress	Madonna et al., 2009; Gutiérrez-Fernández et al., 2013; Oh et al., 2015; Chen et al., 2016
Chronic Obstructive Pulmonary Disease	ASCs (intra-tracheal and intravenous delivery)	Reduction of oxidative damage; restored imbalance of protease/anti-protease ratio, anti-apoptotic activity and increased production of growth factors (HGF, FGF-2, VEGF): protection from lung damage	Ghorbani et al., 2014; Hong et al., 2016
Multiple Sclerosis	ASCs (intrapertoneal/intravenous injection) ASCs conditioned medium	Pathological features diminished, suppression of IFN $\gamma$ and IL-12 in the sera of EAE mice; down-regulation of splenocytes proliferation and IL-17 secretion, alleviation of clinical scores severity; increased production of TGF $\beta$ , IL-4, IL-10, NO, and IDO by splenocytes	Yousefi et al., 2013; Semon et al., 2014; Bowles et al., 2017
Parkinson's disease	ASCs (intra-striatal injection)	Production of growth factors known to promote dopaminergic survival and neuroprotection at the lesion site	McCoy et al., 2008
Alzheimer's disease	ASCs (intra-hippocampal injection)	Reduced oxidative stress, alleviated cognitive impairment and enhanced neurogenesis	Yan et al., 2014
Amyotrophic Lateral Sclerosis	ASCs conditioned medium ASCs (intra-thecal delivery)	NGF-mediated neuroprotection: high motor neuron counts, less activation of microglia and astrocytes, reduced levels of phosphorylated p38 (inflammation and neural death) in the spinal cord; mild temporary subjective clinical improvements (phase I clinical trial)	Fontanilla et al., 2015; Staff et al., 2016
Systemic Sclerosis	ASCs (intra-dermal injection in hyaluronic acid solution)	Improvement in tightening of the skin due to anti-inflammatory soluble factors secretion and expansion of regulatory T-cells	Scuderi et al., 2013
Rheumatoid Arthritis	ASCs (3D-spheroids intra-articular injection)	Suppression of proliferation and migration of activated inflammatory cells and downregulation of inflammatory cytokines; suppression of synovial cell and macrophage function, upregulation of TSG-6 and TGF $\beta$ 1	El-Jawhari et al., 2014; Ueyama et al., 2020
Systemic Lupus Erythematosus	ASCs (intravenous injection)	Immunomodulatory effects: decreased serum levels of immunoglobulins (IgG, IgG1, IgM, and IgE) and autoantibodies; decreased number of Th1 cells and Th17 cells; increased Foxp3- expressing Tregs, which suppress autoimmune processes and maintain peripheral tolerance	Park et al., 2015
Type I Diabetes	ASCs (intra-peritoneal injection)	Recovered levels of glucose, cholesterol, triglycerides, urea nitrogen, and creatinine; alleviation of renal damage through reduction of oxidative stress; decreased TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , and IL-6 cytokine levels and inhibition of the MAPK signalling pathway; improved pancreatic expression of insulin and pancreatic duodenal homeobox 1 (Pdx1); attenuation of Th1 immune response	Vanikar et al., 2010; Lin et al., 2015
Inflammatory Bowel Disease (e.g. Crohn's disease)	ASCs (local application and systemic infusion)	Anti-inflammatory effect, down-regulation of Th1-type cytokines expression, IFN- $\gamma$ and TNF- $\alpha$ , increase of the number of CD4 T cells producing IL-10; proliferation, angiogenesis and remodeling stimulation during the healing process	González et al., 2009a; Panés et al., 2016; Sovrea et al., 2019
GvHD	ASCs (systemic infusion)	Prevention of allogeneic T-cells proliferation; suppression of the proliferation of T cells induced either by mitogens or allogeneic cells; secretion of soluble factors with immuno-suppressive effects; inhibition of inflammatory cytokines production (TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , and IL-12) of stimulated T cells	Yañez et al., 2006; Fang et al., 2007; Tholpady et al., 2009

**Annexe 3 : Tableau illustrant les principaux biomatériaux utilisés en régénération tissulaire parodontale ; source : Liang et al. (10).**

Biomaterials	Target tissue	Characteristics	References
Inorganic biomaterials Hydroxyapatite (HA)	Alveolar bone; cementum	Similar chemical composition and structure to the inorganic phase of bone Osteoconductive Direct bonding effect to natural bone Slow degradation	[45–48]
Tricalcium phosphate (TCP)	Alveolar bone; cementum	Similar chemical composition to the inorganic phase of bone Bioabsorbable Osteoconductive TCP $\alpha$ and TCP $\beta$	[49–53]
Biphasic calcium phosphate (BCP)	Alveolar bone	Mixture of HA and TCP in various ratios to adjust degradation rate and biological activity Similar chemical composition and structure to the inorganic phase of bone	[54–56]
Bioactive glass (BG)	Alveolar bone; cementum	Compositions of bioactive glasses vary Ions dissolved from BG promote angiogenesis, osteogenesis and antibacterial activity Degradation rate vary over a wide range	[57–63]
Natural polymers Collagen	PDL	Most abundant protein in the ECM of alveolar bone, PDL and cementum Biocompatible Low mechanical strength	[64–66]
Gelatin	PDL; alveolar bone; cementum	Safety problems: pathogen transmission, immune reaction Hydrolysis product of collagen	[67–70]
Chitosan	Alveolar bone; PDL; cementum	No pathogen transmission and immune reaction Easily modified for chemical and light crosslinking Derived from chitin Biocompatible Antibacterial property	[71–74]
Synthetic polymers Poly (lactic-co-glycolic acid) (PLGA)	Alveolar bone; PDL	Biocompatible Tunable degradation rate No cell recognition motif	[75–78]
Polycaprolactone (PCL)	Alveolar bone; PDL	Biocompatible Slow degradation rate No cell recognition motif	[79–82]
Composite biomaterials PLGA + CaP	Alveolar bone	Fabricated into two layers (smooth outer layer and rough microporous inner layer) Designed to support GTR membrane and promote alveolar bone regeneration in dogs	[83]
Collagen + HA	Alveolar bone	Fabricated by freeze-drying of both collagen and HA or precipitating HA to collagen BMSCs seeded into the scaffold to promote alveolar bone formation in a dog' periodontal defect	[84]
Chitosan + $\beta$ -TCP	Alveolar bone	Fabricated by freeze-frying HPDLC seeded into the scaffold to recruit host cells and promote osteoblast differentiation	[85]
PLGA + Magnesium	Alveolar bone	Mg in the PLGA increased mechanical strength of composite materials, buffered the acidic by-product of PLGA degradation, and enhanced osteogenic capacity and bone formation in vivo	[86]
Gelatin methacrylate + HA	Alveolar bone	Methacrylate was introduced for photo-crosslinkable The composite induced hPDLSCs to differentiate into osteoblast and promoted new bone formation in nude mice	[67]
Gelatin + $\beta$ -TCP	Alveolar bone	Gelatin and $\beta$ -TCP were mixed in homogenizer and freeze dried New bone tissue and some fibers parallel to bone surfaces were formed in a dog periodontal defect	[87]
PCL + $\beta$ -TCP + CaP coating	PDL; Alveolar bone	PCL electrospun scaffold was fabricated as the PDL layer. A thin layer of CaP was coated on the surface of PCL- $\beta$ -TCP scaffold to improve the osteogenic capacity CaP coating induced more bone formation	[88]
PGA PCL	PDL; Alveolar bone	Microchannels in the PDL layer were designed to guide fibers formation Porous structure was fabricated to allow cell proliferation No organized fiber insertion in PDL and bone interface	[89]
PCL + HA	Alveolar bone; PDL; cementum	Three layers of scaffold design was used to mimic the architecture of periodontium No organized fiber insertion in PDL and bone interface	[90]
Chitin + PLGA + BCG	Alveolar bone; cementum; PDL	PLGA was added to increase degradation time and improve mechanical stability. BCG enhanced osteogenic capacity in bone and cementum layers.	[91]

**Annexe 4 : Tableau illustrant les études animales précliniques associant MSC et biomatériaux dans le cadre de la régénération parodontale ; source : Iwasaki et al. (75).**

Cell Type, Author (Year)	Animal	Scaffold	Observation Period	Results	Regenerated Tissues
BM-MSC					
Kawaguchi et al. (2004) [10]	Dog	Collagen gel	4 weeks	BM-MSC induced more periodontal regeneration than scaffold alone.	CM, PDL, AB
Hasegawa et al. (2006) [11]	Dog	Collagen gel	4 weeks	GFP-labelled transplanted cells were found in regenerated tissues.	CM, PDL, AB
Weng et al. (2006) [12]	Dog	Calcium alginate	12 weeks	BM-MSC increased bone regeneration in periodontal defects.	AB
Li et al. (2009) [13]	Dog	Collagen membrane	8 weeks	Cryopreserved BM-MSC induced periodontal regeneration.	CM, PDL, AB
Wei et al. (2010) [14]	Dog	-	6 weeks	After BrdU-BM-MSC transplantation, some osteoblasts and fibroblasts were BrdU <sup>+</sup> .	CM, PDL, AB
Yang et al. (2010) [15]	Rat	Gelatin beads	3 weeks	Transplanted GFP-BM-MSC were integrated in new CM, PDL, and AB.	CM, PDL, AB
Tsumanuma et al. (2011) [16]	Dog	b-TCP, PGA	8 weeks	CM was thicker in PDLSC defects compared with APC and control.	CM, PDL, AB
Wei et al. (2010) [14]	Dog	-	6 weeks	transplantation, some osteoblasts and fibroblasts were BrdU <sup>+</sup> .	CM, PDL, AB
Yang et al. (2010) [15]	Rat	Gelatin beads	3 weeks	Transplanted GFP-BM-MSC were integrated in new CM, PDL, and AB.	CM, PDL, AB
Tsumanuma et al. (2011) [16]	Dog	b-TCP, PGA	8 weeks	CM was thicker in PDLSC defects compared with APC and control.	CM, PDL, AB
Simsek et al. (2012) [17]	Dog	PRP	8 weeks	BM-MSC+PRP showed periodontal regeneration.	CM, PDL, AB
Zhou et al. (2012) [18]	Dog	PLGA	6 weeks	BM-MSC with OPG overexpression enhanced periodontal regeneration.	CM, PDL, AB
Cai et al. (2015) [19]	Rat	PLGA/ $\epsilon$ -caprolactone	6 weeks	Chondrogenic induction of BM-MSC increased periodontal regeneration.	CM, PDL, AB
Nagahara et al. (2015) [20]	Dog	b-TCP/collagen	8 weeks	b-TCP enhanced AB formation by BM-MSC without affecting CM and PDL regeneration.	CM, PDL, AB
Paknejad et al. (2015) [21]	Dog	Bio-Oss <sup>®</sup> (ABBM)	8 weeks	BM-MSC regenerated more CM and PDL than scaffold.	CM, PDL, AB
Liu et al. (2016) [22]	Dog	collagen-HA	24 weeks	BM-MSC + collagen/HA induce new CM, PDL, and AB formation.	CM, PDL, AB
PDLSC(PDL)					
Nakahara et al. (2004) [23]	Dog	Collagen sponge	4 weeks	More CM was regenerated in PDL-transplanted defects than in empty defects.	CM
Akizuki et al. (2005) [24]	Dog	Hyaluronic acid sheet	8 weeks	Periodontal regeneration found 3/5 defects after PDL cell sheet transplantation.	CM, PDL, AB

Hasegawa et al. (2005) [25]	Rat	-	4 weeks	PDL cell sheet transplantation created new CM-PDL structures.	CM, PDL
Flores et al. (2008) [26]	Rat	-	5 weeks	PDL cells with osteogenic differentiation regenerated more CM.	CM, PDL, AB
Liu et al. (2008) [27]	Minipig	HA/TCP	12 weeks	PDLSC regenerated periodontal tissues lost by ligature-induced chronic inflammation.	CM, PDL, AB
Iwata et al. (2009) [28]	Dog	HA/b-TCP	6 weeks	Triple layered PDL sheet-induced periodontal tissue regeneration.	CM, PDL, AB
Ding et al. (2010) [29]	Minipig	HA/TCP	12 weeks	Allogenic and autologous PDLSC regenerated induced periodontal tissues.	CM, PDL, AB
Park et al. (2011) [30]	Dog	-	8 weeks	PDLSC induced more CM, PDL, and AB than DPSC and periapical follicular stem cells.	CM, PDL, AB
Suaid et al. (2011) [31]	Dog	Collagen composite	12 weeks	PDLSC + GTR membrane promoted periodontal regeneration in class II furcation.	CM, PDL, AB
Tsumanuma et al. (2011) [16]	Dog	b-TCP, PGA	8 weeks	CM was thicker in PDLSC defects compared with APC and control.	CM, PDL, AB
Nunez et al. (2012) [32]	Dog	Collagen sponge	12 weeks	PDL and cementum derived cells regenerated new connective attachment.	CM, PDL
Suaid et al. (2012) [33]	Dog	Collagen composite	12 weeks	PDLSC + GTR membrane promoted periodontal regeneration in class III furcation.	CM, PDL, AB
Mrozik et al. (2013) [34]	Sheep	Gelfoam	4 weeks	Allogenic PDLSC + gelfoam induced CM, PDL, and AB in dehiscence defect model.	CM, PDL, AB
Menicanin et al. (2014) [35]	Sheep	Gelfoam	8 weeks	Autologous PDLSC regenerated periodontal tissues with Shapely's fiber structure.	CM, PDL, AB
Fu et al. (2014) [36]	Minipig	HA/TCP	12 weeks	Allogenic PDLSC and SHED transplantation resulted in periodontal regeneration.	CM, PDL, AB
Han et al. (2014) [37]	Rat	Gelatin sponge	4 weeks	Allogenic PDLSC transplantation resulted in CM, PDL, and AB regeneration at day 21.	CM, PDL, AB
Iwasaki et al. (2014) [38]	Rat	Amniotic membrane	4 weeks	PDLSC on amniotic membrane induced periodontal regeneration.	CM, PDL, AB
Tsumanuma et al. (2016) [39]	Dog	b-TCP, PGA, collagen	8 weeks	CM regeneration was significant in allogenic PDLSC transplantation without side effects.	CM, PDL, AB
Iwasaki et al. (2019) [40]	Rat	Amniotic membrane	4 weeks	Engraftment of transplanted PDLSC was limited in regenerated periodontal tissues.	CM, PDL, AB

DPSC					
Park et al. (2011) [30]	Dog	-	8 weeks	PDLSC induced more CM, PDL, and AB than DPSC and periapical follicular stem cells	CM, PDL, AB
Khorsand et al. (2013) [41]	Dog	Bio-Oss® (ABBM)	8 weeks	DPSC induced more CM and PDL than the scaffold group. No difference in AB.	CM, PDL
Cao et al. (2015) [42]	Minipig	-	12 weeks	DPSC with HGF overexpression induced more periodontal tissues than DPSC.	CM, PDL, AB
ADSC					
Tobita et al. (2013) [43]	Dog	PRP	8 weeks	ADSC transplantation showed more CM, PDL, and AB formation.	CM, PDL, AB
Ozasa et al. (2014) [44]	Dog	Bolheal® (fibrin gel)	6 weeks	ADSC induced new CM, PDL, and AB formation.	CM, PDL, AB
Venkataiah et al. (2019) [45]	Minipig	Bolheal® (fibrin gel)	4 weeks	Allogenic ADSC regenerated periodontal tissues, comparable with autologous ADSC.	CM, PDL, AB
APC					
Jiang et al. (2010) [46]	Dog	b-TCP	12 weeks	APC+b-TCP improved periodontal regeneration in class III function.	CM, PDL, AB
Tsumanuma et al. (2011) [16]	Dog	b-TCP, PGA	8 weeks	CM was thicker in PDLSC defects compared with APC and control.	CM, PDL, AB
GMSC					
Fawzy El-Sayed et al. (2012) [47]	Minipig	Collagen	12 weeks	GMSC-transplanted sites demonstrated better CAL, PD, GR, and HAL than the control.	CM, PDL, AB
Yu et al. (2013) [48]	Dog	-	8 weeks	GFP-labelled GMSC integrated in regenerated tissues.	CM, PDL, AB
SHED					
Fu et al. (2014) [36]	Minipig	HA/TCP	12 weeks	Allogenic PDLSC and SHED transplantation resulted in periodontal regeneration.	CM, PDL, AB

AB: alveolar bone, ABBM: anorganic bovine bone matrix, ADSC: adipose tissue-derived stem cells, APC: alveolar bone periosteal cells, BM: bone marrow, CAL: clinical attachment level, CM: cementum, DPSC: dental pulp stem cells, GFP: green fluorescent protein, GMSC: mesenchymal stem cells from gingival connective tissue, GR: gingival recession, HA: hydroxyapatite, HAL: histological attachment level, HGF: hepatocyte growth factor, MSC: bone marrow derived-mesenchymal stem cells, OPG: osteoprotegerin, PD: pocket depth, PDL: periodontal ligament, PDLSC: periodontal ligament stem cells, PGA: polyglycolic acid, PLGA: poly-lactide-co-glycolide acid, SHED: stem cells from human exfoliated deciduous teeth, TCP: tricalcium phosphate.

## Annexe 5 : Méthode de Murray : Préparation d'échantillon pour l'imagerie par microscopie à feuille de lumière

### A. Inclusion en agarose

#### a. Le SPIM

De l'agarose 1% Low Melting (LM) liquide est coulé dans le puits d'une plaque 6 puits. L'échantillon est déposé dans le puits lorsque l'agarose commence à polymériser. Une deuxième couche d'agarose 1% LM liquide est déposée pour recouvrir la totalité de l'échantillon. Après polymérisation de la

deuxième couche d'agarose : 15min à température ambiante (TA) et 15min à 4°C. L'échantillon inclus en agarose est retiré du puits grâce à un emporte-pièce de 8mm de diamètre.

#### b. Le MacroSPIM

De l'agarose 1% Low Melting (LM) liquide est coulé dans des seringues de 5ml préalablement découpées et placées sur de la glace. L'échantillon est déposé dans le moule lorsque l'agarose commence à polymériser. Une deuxième couche d'agarose 1% LM liquide est déposée pour recouvrir la totalité de l'échantillon. Après polymérisation de la deuxième couche d'agarose : 15min à TA et 15min à 4°C, la carotte d'agarose complète contenant l'échantillon est démoulée.

#### B. Déshydratation

La carotte d'agarose est déshydratée en méthanol 100% (MeOH – *Sigma Aldrich*) pendant 4 heures à TA sous agitation, puis sur la nuit à TA dans du MeOH 100% renouvelé une première fois et finalement 6 heures dans du MeOH 100% renouvelé une deuxième fois.

#### C. Transparisation

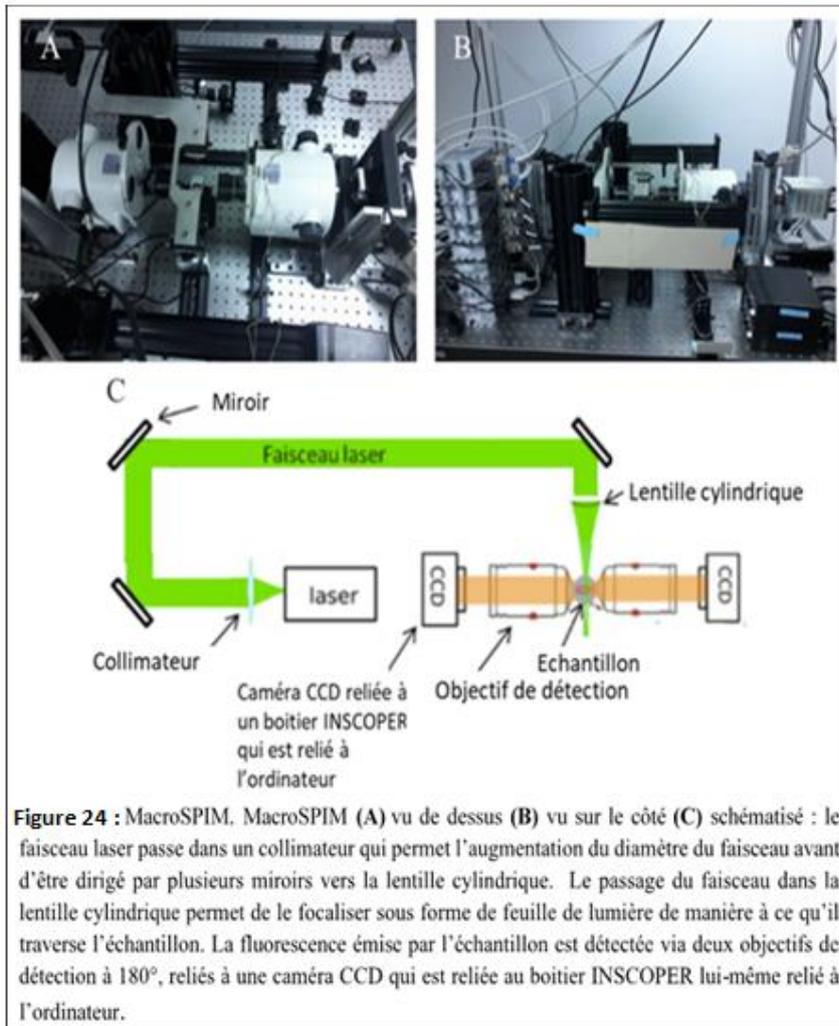
La carotte d'agarose déshydratée est placée dans une solution de MeOH 100%-Benzyl Alcool (BA-*Alfa-Aesar*)-Benzyl Benzoate (BB-*Sigma-Aldrich*) dans les proportions volumiques 1 :2 :3, 30 min sous agitation à TA. La solution est ensuite remplacée par une solution de 1BA:2BB, 24h sous agitation à TA. Ce bain est renouvelé, jusqu'à transparisation complète et apparente de l'échantillon.

### **Annexe 6 : Microscopie à feuille de lumière**

#### A. Le SPIM

Le disque d'agarose contenant l'échantillon est maintenu dans un porte-échantillon imprimé grâce à une imprimante 3D. Le porte échantillon est en suspension dans une cuve en quartz elle-même déposée sur un porte-cuve. La cuve est ensuite remplie de PBS, si l'échantillon n'a pas été transparisé, ou de BABB si l'échantillon a été transparisé. Le faisceau laser est dirigé grâce à plusieurs miroirs vers l'objectif d'illumination (10x) positionné latéralement. Le dispositif optique permet de mettre en forme le faisceau laser pour obtenir une feuille de lumière qui excite l'ensemble des fluorophores compris dans un plan de l'échantillon. Les photons émis sont collectés perpendiculairement au plan d'excitation. Le SPIM peut être équipé de différents objectifs de détection avec des grossissements différents : de 5x à 20x qui peuvent être immergés. Le microscope est équipé de deux lasers : 488nm et 532nm pour l'excitation et de trois filtres différents pour la détection. L'échantillon est déplacé en Z permettant l'acquisition de plans successifs. Le signal émis par l'échantillon est récupéré via une caméra CCD. Tous les composants du SPIM sont pilotés par un boîtier de contrôle INSCOPER, lui-même relié à un ordinateur.

## B. Le MacroSPIM



La carotte d'agarose est maintenue droite au fond d'une cuve en quartz. La cuve est ensuite remplie de la solution de BA-BB 1 : 2 avant d'être placée sur la platine du microscope. L'échantillon est illuminé grâce à un objectif positionné latéralement. Le dispositif optique permet de mettre en forme le faisceau laser pour obtenir une feuille de lumière qui excite l'ensemble des fluorophores compris dans un plan de l'échantillon. Les photons sont collectés perpendiculairement au plan d'excitation (Figure 24). Le MacroSPIM est équipé d'une lentille permettant un grandissement de 0,6x et peut être équipé de deux

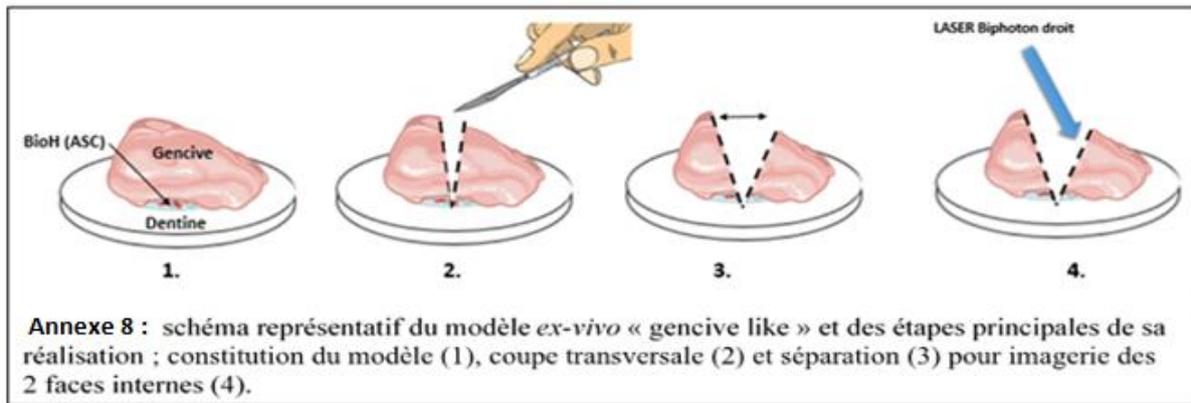
objectifs. L'objectif 2x permet d'obtenir un grandissement compris entre 1,2x et 9,6x tandis que l'objectif 5x permet d'obtenir un grandissement compris entre 3x et 24x. Le microscope est équipé de quatre lasers: 405nm, 488nm, 561nm et 642nm pour l'excitation, et vingt-quatre filtres différents au niveau de la détection. Pour réaliser l'imagerie 3D, l'échantillon est déplacé en Z, permettant l'acquisition de plans successifs. Deux caméras se trouvent latéralement de part et d'autre de l'échantillon permettant son acquisition en Z à 180°.

### Annexe 7 : Traitement d'image

Dans le but de mettre en évidence une variation de l'intensité du signal de fluorescence en fonction des conditions de marquage des ASC dans les biohybrides, une projection en Z est effectuée sous Image J à partir de la pile d'acquisitions. S'en suit une mesure de l'intensité moyenne selon une dynamique d'échelle de gris 150-2000. Le bruit de fond est éliminé par « subtrack background » afin de construire une « profil plot » sur l'ensemble de l'image d'où sont extraites les valeurs d'intensité moyenne. Afin d'étudier la variation en nombre, en taille et en circularité des cellules, les projections en Z d'intensité moyennes sont segmentées selon un seuil de 3%. Les valeurs relatives à la taille, au nombre, à l'aire et au périmètre sont extraites. La circularité est calculée selon la formule : circularité

$$= 4\pi x \frac{\text{Aire}}{(\text{Périmètre})^2}$$

## Annexe 8 : Mise au point du modèle *ex vivo* « gencive-like »



## Annexe 9 : Constitution de sphéroïdes selon le protocole en agitation lente.

La suspension cellulaire est ajustée avec du milieu de culture  $\alpha$ MEM complet ou EGM2 supplémenté en 1% SP à une concentration cellulaire de 1million de cellules/mL pour constituer des sphéroïdes de 50 000 cellules. Ces cellules sont ensuiteensemencées en plaque 96 puits ULA (Costar Ultra Low Attachment) à raison de 50 000 cellules dans 50  $\mu$ L par puits. La plaque est placée à 37°C, 5% CO<sub>2</sub> sous agitation ample constante. Le lendemain, 150  $\mu$ L de milieu de culture sont rajoutés. La moitié du milieu de culture est renouvelée tous les 2-3 jours.

## RESUME EN ANGLAIS

---

BROCA Clothilde

2022 TOU3 3052

### **Adipose-derived stromal/stem cells in periodontal engineering : development of innovative ex vivo study models dedicated to monitoring cellular interactions**

---

#### ABSTRACT

Periodontitis are chronic inflammatory diseases of the teeth's supporting tissues which current treatments remain limited. Tissue engineering combining mesenchymal stromal cells of adipose tissue (ASC) with platelet lysate hydrogel (PLh) seems to be a promising strategy for periodontal regeneration. However, to date, there is little information on the interactions between grafted ASC and endogenous gingival MSC (G-MSC) driving this process. Thus, the objective of our project is to develop relevant models in order to study, by 3D microscopy approaches, the contribution of transplanted ASC to the periodontal regeneration process, and in particular their cellular interactions with endogenous G-MSC in the context of periodontal tissue engineering.

This work allowed the synthesis and valorization of the data generated by the team. As such, effective fluorescent tracers have been identified for dynamic co-culture tracking of human ASC and MSC-G. Two *ex vivo* study models have also been developed using a PLh of labeled ASC, either integrating a spheroid of MSC-G or their progenitors, or placed between a human gum explant and a thin slice of dentin, for 3D exploration by light sheet microscopy. The selected probe in 2D experiments, targeting a specific organelle of ASC, does not give an account of their spreading through the PLh between gingiva and dentin over time. Concerning the first model, an alternative protocol should be tested to achieve a suitable constitution of spheroids derived from periodontal stromal vascular fraction (SVF), before studying their interaction with ASC in the PLh. These promising models require additional developments, especially to overcome constraints related to samples' preparation for imaging. These latter will thus allow to decipher biological mechanisms involved in homeostatic, immune and stromal reprogramming of the periodontium, in order to define the basis for a safe and rational translation into veterinary and human clinic.

---

**Cellules stromales du tissu adipeux en ingénierie tissulaire des parodontites :  
développement de modèles d'étude ex vivo innovants dédiés au suivi des  
interactions cellulaires**

---

RESUME

Les parodontites sont des maladies inflammatoires chroniques des tissus de soutien des dents dont les traitements actuels demeurent limités. L'ingénierie tissulaire combinant des cellules stromales mésenchymateuses du tissu adipeux (ASC) à un hydrogel de lysat plaquettaire (hLP) constitue une stratégie prometteuse dans le cadre de la régénération parodontale. Cependant, il existe à ce jour peu d'informations sur les interactions entre les ASC greffées et les MSC gingivales (MSC-G) endogènes à l'origine de ce processus. Ainsi, l'objectif de notre projet est de mettre au point des modèles pertinents afin d'étudier, par des approches de microscopie 3D, la contribution des ASC transplantées au processus de régénération parodontale, et notamment leurs interactions cellulaires avec les MSC-G endogènes dans le cadre de l'ingénierie tissulaire des parodontites.

Ce travail a permis la synthèse et la valorisation des données générées par l'équipe. A ce titre, des traceurs fluorescents efficaces ont été identifiés pour le suivi de co-cultures d'ASC et de MSC-G humaines. Deux modèles d'étude *ex vivo* ont été développés grâce à un hLP d'ASC marquées, soit intégrant un sphéroïde de MSC-G ou de leurs progéniteurs, soit placé entre un explant de gencive humaine et une tranche de dentine, en vue de leur exploration en 3D par microscopie à feuille de lumière. La sonde sélectionnée en 2D, ciblant un organite des ASC, ne rend pas compte de leur étalement dans l'hLP entre gencive et dentine au cours du temps. Concernant le premier modèle, un protocole alternatif devra être testé pour parvenir à une constitution convenable de sphéroïdes issus de fraction stromale vasculaire (SVF) parodontale, avant d'étudier leur interaction avec des ASC dans un hLP. Ces modèles s'avèrent prometteurs mais nécessitent des mises au point supplémentaires, notamment afin de pallier les contraintes liées à la préparation des échantillons pour l'imagerie. Ces derniers permettront ainsi de décrypter les mécanismes biologiques impliqués dans la reprogrammation homéostatique, immunitaire et stromale du parodonte, afin de définir les bases pour une translation en clinique vétérinaire et humaine sécurisée et rationnelle.

---

**TITRE EN ANGLAIS : Adipose-derived stromal/stem cells in periodontal engineering : development of innovative ex vivo study models dedicated to monitoring cellular interactions**

---

**MOTS-CLES :** Cellules souches mésenchymateuses, Cellules stromales du tissu adipeux, Thérapie cellulaire, Ingénierie tissulaire, Parodontite, Régénération parodontale, Modèles d'étude, Marqueurs cellulaires, Suivi des interactions cellulaires, Imagerie 3D, Microscope à feuille de lumière.

---

DISCIPLINE ADMINISTRATIVE : Chirurgie dentaire

---

Université Toulouse III - Paul Sabatier  
Faculté de Santé - Département d'Odontologie 3 chemin des Maraîchers 31062 Toulouse Cedex 09

---

Directeur de thèse : Dr Paul MONSARRAT