

Université de Montréal

**Caractérisation immunocytochimique des tissus minéralisés radiculaires  
de molaires de rats suite à une exposition pulpaire**

par

Amal Méziane

Département de santé buccale

Faculté de médecine dentaire

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures

en vue de l'obtention du grade de

Maître ès sciences (M.Sc.)

en médecine dentaire, option orthodontie

Avril, 2002

© Amal Méziane, 2002



Université de Montréal  
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

**Caractérisation immunocytochimique des tissus minéralisés radiculaires  
de molaires de rats suite à une exposition pulpaire**

présenté par :  
Amal Méziane

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dr Viken Masseredjian  
Dr Antonio Nanci  
Dr Jean Barbeau  
Dr René Voyer



Mémoire accepté le : .....

## SOMMAIRE

L'orthodontie est un domaine basé sur la biologie du mouvement dentaire. Le déplacement de la dent se fait par un phénomène d'apposition-résorption osseuse qui s'accompagne d'une résorption radiculaire, mécanisme physiologique qui devient, cependant, pathologique lorsque les forces employées sont excessives et de longue durée. Il apparaît donc important d'approfondir nos connaissances dans la physiologie des tissus minéralisés détruits par la résorption, à savoir le ciment et, dans les cas plus sévères, la dentine. Les enjeux seraient alors la prévention de cette résorption et le contrôle des déplacements dentaires.

Nous nous sommes intéressés à un modèle expérimental d'inflammation pulpaire (Hamamoto *et al.*, 1989a; 1996) qui propose non seulement la formation de nouveau ciment par des cellules épithéliales activées, mais également la formation de dentine réparatrice. L'objectif de cette étude était donc de caractériser ces deux tissus minéralisés, dans des conditions de réparation, par immunocytochimie à l'or colloïdal. Cette technique de biochimie « sur coupe » nous permet non seulement d'observer l'ultrastructure des tissus, mais également de déterminer la distribution de certains constituants de la matrice extracellulaire.

Les chambres pulpaire des premières et secondes molaires maxillaires de 22 rats mâles Wistar pesant entre 100 et 160 g sont perforées et laissées ouvertes, les dents controlatérales servant de contrôle. Les animaux sont sacrifiés 11 jours après l'intervention. Les molaires sont fixées et décalcifiées au micro-onde. Les molaires sont ensuite enrobées dans la résine LR White® et sont préparées pour l'observation au microscope optique et le marquage à l'or colloïdal. Nous avons testé l'immunoréactivité des tissus pour deux protéines osseuses majeures que l'on retrouve dans le ciment, la sialoprotéine osseuse (BSP) et l'ostéopontine (OPN), ainsi que deux protéines amélaire, l'amélogénine (AMEL) et l'améloblastine (AMBN) impliquées dans la réparation.

La formation de dentine réparatrice est observée sur toutes les dents dont la pulpe est exposée, avec un gradient croissant en direction apicale et des inclusions cellulaires. Exceptionnellement, une excroissance du ciment cellulaire est observée à l'extrémité apicale associée à des groupes de cellules épithéliales qui ne semblent pas activées. L'ultrastructure et l'analyse immunocytochimique permettent de déterminer que la dentine réparatrice est un tissu polymorphe, riche en collagène et en protéines non collagéniques (BSP et l'OPN), associé à des cellules de type fibroblaste présentant une immunoréactivité importante pour l'OPN. Ces mêmes caractéristiques se

retrouvent dans le cément dont l'ultrastructure ne semble pas être affectée par l'inflammation pulpaire. Bien qu'aucune protéine amélaire n'ait été détectée au sein de ces tissus, nos résultats n'excluent pas pour autant leur présence, soit en petite quantité non détectable, soit sous une autre forme, soit temporaire.

La présence de cellules épithéliales, dans la région radiculaire apicale, constitue une caractéristique physiologique des molaires de rats et toute extrapolation à la dent humaine mérite des réserves. Cependant, la présence de ces cellules au contact du cément semble indiquer une éventuelle transformation épithélio-mésenchymateuse que seule une étude échelonnée dans le temps permettrait de déterminer. Notre étude a mis en évidence le fort potentiel de réparation « naturelle » de la pulpe. L'emphase doit être mise sur ce potentiel afin de promouvoir des thérapeutiques « biologiques » qui permettront de contrôler cette réparation.

## TABLE DES MATIÈRES

<b>SOMMAIRE .....</b>	<b>III</b>
<b>TABLE DES MATIÈRES.....</b>	<b>VI</b>
<b>LISTE DES TABLEAUX .....</b>	<b>IX</b>
<b>LISTE DES FIGURES.....</b>	<b>X</b>
<b>LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS.....</b>	<b>XI</b>
<b>REMERCIEMENTS.....</b>	<b>XIV</b>
<b>1. INTRODUCTION .....</b>	<b>1</b>
<b>2. REVUE DE LA LITTÉRATURE .....</b>	<b>4</b>
2.1. GÉNÉRALITÉS.....	4
2.2. LA FORMATION DE L'ORGANE DENTAIRE .....	5
2.3. L'ÉNIGME DES RESTES ÉPITHÉLIAUX DE MALASSEZ .....	7
2.4. LA DENTINE .....	9
2.4.1. <i>La dentine physiologique.....</i>	<i>10</i>
2.4.2. <i>La dentine réparatrice.....</i>	<i>11</i>
2.5. LE CÉMENT .....	12
2.5.1. <i>Les différents types de ciment.....</i>	<i>13</i>
2.5.2. <i>La jonction dentino-cémentaire.....</i>	<i>14</i>
2.5.3. <i>La couche hyaline de Hopewell-Smith .....</i>	<i>15</i>
2.5.4. <i>Le ciment intermédiaire.....</i>	<i>16</i>
2.5.5. <i>Les cémentoblastes .....</i>	<i>18</i>
2.5.5.1. <i>La différenciation des cémentoblastes.....</i>	<i>18</i>
2.5.5.2. <i>Transformation épithélio-mésenchymateuse? .....</i>	<i>20</i>

2.6.	LES MATRICES EXTRACELLULAIRES DES TISSUS MINÉRALISÉS DENTAIRES .....	24
2.6.1.	<i>Les protéines de la matrice osseuse</i> .....	25
2.6.1.1.	L'ostéopontine (OPN) .....	26
2.6.1.2.	La sialoprotéine osseuse (BSP) .....	27
2.6.2.	<i>Les protéines amélares</i> .....	28
2.6.2.1.	Les amélogénines (AMEL) .....	28
2.6.2.2.	L'améline/ améloblastine (AMBN).....	30
2.6.3.	<i>Les cellules de la gaine épithéliale de Hertwig (GEH) sécrètent-elles des protéines amélares ?</i> .....	31
2.6.4.	<i>L'expression des protéines de la MEC est-elle spécifique? ...</i>	32
2.7.	CONTRIBUTION DES CONNAISSANCES ACTUELLES SUR LA CÉMENTOGENÈSE ET LA RÉGÉNÉRATION PARODONTALE .....	35
2.7.1.	<i>Utilisation d'extraits de matrice amélaire : rêve ou réalité?</i> .	36
2.7.2.	<i>Efficacité clinique de EMDOGAIN®</i> .....	38
2.8.	BUTS DE L'ÉTUDE .....	39
<b>3.</b>	<b>TECHNIQUE EXPÉRIMENTALE .....</b>	<b>42</b>
3.1.	PROCÉDURE CHIRURGICALE .....	42
3.2.	PRÉPARATION DES TISSUS POUR LES ANALYSES HISTOLOGIQUES ET IMMUNOCYTOCHIMIQUES .....	44
3.2.1.	<i>Immunocytochimie</i> .....	47
<b>4.</b>	<b>RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX.....</b>	<b>50</b>
4.1.	CONSIDÉRATIONS RELATIVES À LA TECHNIQUE EXPÉRIMENTALE .	50
4.2.	MICROSCOPIE OPTIQUE.....	55
4.2.1.	<i>Dents contrôles</i> .....	55
4.2.2.	<i>Dents traitées</i> .....	57
4.3.	MICROSCOPIE ÉLECTRONIQUE .....	66



4.3.1.	<i>Fixation et décalcification par micro-onde</i> .....	66
4.3.2.	<i>Dents contrôles</i> .....	68
4.3.2.1.	Le ciment .....	68
4.3.2.2.	Jonction dentino-cémentaire.....	70
4.3.2.3.	La dentine .....	71
4.3.3.	<i>Dents traitées</i> .....	71
4.3.3.1.	Les bactéries .....	72
4.3.3.2.	La dentine .....	72
4.3.3.3.	La zone intermédiaire .....	73
4.3.3.4.	La dentine réparatrice .....	73
4.3.3.5.	Tableaux récapitulatifs de l'immunoréactivité des dents ...	75
<b>5.</b>	<b>DISCUSSION</b> .....	<b>91</b>
5.1.	LE CÉMENT .....	94
5.2.	LES PROTÉINES AMÉLAIRES .....	95
5.3.	LA JONCTION DENTINE-CÉMENT .....	96
5.4.	ACTIVATION DES CELLULES ÉPITHÉLIALES?.....	97
5.5.	PROTÉINES AMÉLAIRES ET DENTINE RÉPARATRICE.....	98
5.6.	LA DENTINE RÉPARATRICE .....	100
5.6.1.	<i>Modèles expérimentaux</i> .....	100
5.6.2.	<i>Description de la DR</i> .....	102
5.6.3.	<i>Distribution des protéines non collagéniques</i> .....	104
5.6.4.	<i>Facteurs responsables de la formation de la DR</i> .....	105
5.6.5.	<i>Cellules responsables de la formation de la DR</i> .....	108
5.7.	POTENTIEL DE RÉPARATION TISSULAIRE « NATURELLE » .....	111
5.8.	PERSPECTIVES FUTURES .....	113
<b>6.</b>	<b>CONCLUSION</b> .....	<b>115</b>
<b>7.</b>	<b>BIBLIOGRAPHIE</b> .....	<b>117</b>

## LISTE DES TABLEAUX

<b>TABLEAU I</b> : LES DIFFÉRENTS ANTICORPS UTILISÉS .....	49
<b>TABLEAU II</b> : DISTRIBUTION SCHÉMATIQUE DES ANTICORPS (DENTS CONTRÔLES).....	75
<b>TABLEAU III</b> : DISTRIBUTION SCHÉMATIQUE DES ANTICORPS (DENTS TRAITÉES).....	75

## LISTE DES FIGURES

FIGURE 1A : ILLUSTRATION DE LA FRAISE UTILISÉE POUR LES PERFORATIONS. ....	43
FIGURE 1B : ILLUSTRATION SCHÉMATIQUE DES TECHNIQUES DIRECTE ET INDIRECTE D'IMMUNO-MARQUAGE À L'OR COLLOÏDAL. ....	49
FIGURE 2 : PHOTOGRAPHIE OCCLUSALE DES MOLAIRES TRAITÉES.....	53
FIGURE 3 : MICROTOMOGRAPHIE DES MOLAIRES TRAITÉES .....	54
FIGURE 4 : MICROSCOPIE OPTIQUE DES DENTS TRAITÉES ET CONTRÔLES .....	61
FIGURE 5 : MICROSCOPIE OPTIQUE DES DENTS TRAITÉES .....	62
FIGURE 6 : MICROSCOPIE OPTIQUE DE LA DENTINE RÉPARATRICE.....	63
FIGURE 7 : MICROSCOPIE OPTIQUE DE LA RÉGION APICALE.....	64
FIGURE 8 : ILLUSTRATION DES ODONTOBLASTES DE LA RÉGION APICALE DES DENTS CONTRÔLES .....	65
FIGURE 9 : IMAGES PAR MET DES TISSUS MINÉRALISÉS DES DENTS CONTRÔLES .....	77
FIGURE 10 : IMAGES PAR MET D'UN CÉMENTOCYTE.....	78
FIGURE 11 : IMAGES PAR MET DE LA JONCTION DENTINO-CÉMENTAIRE (INCUBATIONS AVEC AMBN ET AMEL) .....	80
FIGURE 12 : IMAGES PAR MET DE LA JONCTION DENTINO-CÉMENTAIRE (INCUBATIONS AVEC AMBN, BSP ET OPN) .....	82
FIGURE 13 : IMAGES PAR MET DE LA JONCTION DENTINO-CÉMENTAIRE (INCUBATIONS AVEC AMBN ET AMEL) .....	83
FIGURE 14 : IMAGES PAR MET DE LA DENTINE RÉPARATRICE .....	84
FIGURE 15 : IMAGES PAR MET DES PATRONS GLOBULAIRES DE LA DENTINE RÉPARATRICE .....	86
FIGURE 16 : COMPARAISONS IMMUNOCYTOCHIMIQUES DE LA DENTINE RÉPARATRICE AVEC DIFFÉRENTS ANTICORPS (AMEL, BSP ET OPN) .....	87
FIGURE 17 : IMAGES PAR MET D'UNE CELLULE DÉGÉNÉRESCENTE.....	88
FIGURE 18 : IMAGES PAR MET DE CELLULES ASSOCIÉES À LA DENTINE RÉPARATRICE	90

## LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS

AMBN :	Améloblastine
AMEL :	Amélogénine
ADN :	Acide désoxyribonucléique
ARNm :	Acide ribonucléique messenger
Ba :	Bactérie
BMP :	Protéine morphogénétique de l'os ( <i>Bone morphogenetic protein</i> )
BSP :	Sialoprotéine osseuse (bone sialoprotein)
CAA :	Cément acellulaire afibrillaire
CAFE :	Cément acellulaire avec des fibres extrinsèques
Cb :	Cémentoblaste
Cc :	Cémentocyte
Ce :	Cellule épithéliale
CCFI :	Cément cellulaire avec des fibres intrinsèques
CCMS :	Cément cellulaire mixte stratifié
°C :	Degré Celsius
De :	Dentine
DR :	Dentine réparatrice

EDTA :	acide éthylène diamine tétra-acétique (ethylene diamine tetraacetic acid)
EFA :	<i>enamel-free area</i>
EMD :	Dérivé de la matrice amélaire ( <i>enamel matrix derivative</i> )
g :	Gramme
GEH :	Gaine épithéliale de Hertwig
gs :	Granule de sécrétion
h:	Heure
IgG:	Immunoglobuline G
jdc:	Jonction dentino-cémentaire
kDa:	kiloDalton
kV :	kiloVolt
L :	Lacune
LP :	Ligament parodontal
LR :	Lacune de résorption
LT :	Lésion tissulaire
m :	Mitochondrie
M :	Mole
MEC :	Matrice extracellulaire
MET :	Microscope électronique à transmission
ml :	Millilitre

mm :	Millimètre
N :	Noyau
nm :	Nanomètre
OA :	Os alvéolaire
Od :	Odontoblaste
OPN :	Ostéopontine
P :	Pulpe
PBS :	Tampon de sel de phosphate (phosphate buffered saline)
pc :	Prolongement cellulaire
PD :	Prédentine
PNC :	Protéine non collagénique
POd :	Prolongement odontoblastique
rEG :	Réticulum endoplasmique granuleux
RM :	Restes épithéliaux de Malassez
td:	Tubuli dentinaires
TEM :	Transformation épithélio-mésenchymateuse
TGF- $\beta$ :	<i>Transforming growth factor- bêta</i>
tf :	Tonofilaments
$\mu\text{m}$ :	Micromètre

## REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier le Dr Viken Masseredjian, mon directeur de maîtrise. Ses connaissances et sa dextérité en orthodontie sont un exemple pour tous ceux qui ont eu le privilège de le côtoyer, et dont j'ai eu la chance de faire partie. Son enseignement m'a appris la précision et la patience mais surtout la philosophie de l'excellence que je me suis fixée comme objectif.

J'adresse également mes profonds remerciements au Dr Antonio Nanci, codirecteur de mon projet de recherche, qui m'a fait partager sa passion pour l'histologie. Il m'a accueillie ouvertement dans son laboratoire et m'a scrupuleusement guidée tout au long de ce projet. Son enthousiasme et son énergie dans la recherche ont rendu ce travail de plus en plus captivant.

Mes sincères remerciements au Dr Jean Barbeau pour avoir accepté de faire partie du jury de ce mémoire comme président-rapporteur. Sa disponibilité et sa contribution ont été grandement appréciées.

Également, mes sincères remerciements au Dr René Voyer, dont la gentillesse n'est plus à démontrer, pour avoir spontanément accepté de participer au jury de ce mémoire, et y avoir consacré le temps nécessaire.

Je tiens à exprimer ma très vive reconnaissance à Madame Sylvia Zalzal et Madame Micheline Fortin qui ont contribué à l'élaboration de ce mémoire toujours avec professionnalisme et humour, dans une ambiance particulièrement agréable.

Toujours au sein du laboratoire, je tiens à remercier toutes les personnes qui ont participé de près ou de loin à ce travail et dont les encouragements ont été précieux: le Dr Victor Arana-Chavez qui m'a enseigné les techniques de fixation et de décalcification au micro-onde utilisées dans cette étude, Dr Giovanna Orsini, Dr Olivier Laboux, Madame Rima Wazen et Dr Paulo Tambasco de Oliveira dont l'aide a été très appréciée.

Je désire également remercier Dr Claude Remise pour ce mémorable appel téléphonique annonçant mon acceptation dans cet enrichissant programme d'Orthodontie. Derrière ce pilier du département se cache un homme de cœur que j'ai eu le plaisir de découvrir.

Je souhaiterais remercier Monsieur Erik Buelens, de la compagnie SkyScan, pour la qualité de l'imagerie au microtomographe.



Cette recherche n'aurait pu voir le jour sans le financement du Fonds Paul-Geoffrion, que je tiens particulièrement à remercier, ainsi que les Instituts de Recherche en Santé du Canada.

***Je dédie ce mémoire à toutes les personnes qui me sont chères:***

*À ma grand-mère, merci de ta bénédiction de tous les jours,*

*À mon père, merci de m'avoir permis d'accéder à cette indépendance et de réaliser mon Rêve,*

*À ma mère, même loin de moi, l'élaboration de ce mémoire me rapprochait chaque jour un peu plus de toi,*

*À mes trois moitiés, mes deux jumelles et mon meilleur ami,*

*À mes fidèles confidentes,*

*À toi, mon passé, mon présent et mon futur,*

*À tous ceux que j'ai eu la chance de croiser sur mon chemin et qui m'ont fait partager leurs richesses.*

# I N T R O D U C T I O N

## 1. INTRODUCTION

Les recherches dans le domaine de l'orthodontie sont en grande partie axées sur la technologie des fils et des boîtiers dans le but d'améliorer la rapidité, la simplicité et l'efficacité des traitements visant à aligner les dents et à corriger les malocclusions dentaires. Mais l'orthodontie est avant tout une discipline basée sur la biomécanique permettant de délivrer des forces adéquates pour influencer les remaniements parodontaux. Cependant, l'effet de ces forces biomécaniques sur le déplacement dentaire reste limité par les structures tissulaires impliquées. Il apparaît donc utile de chercher à élargir nos connaissances biologiques afin de nous aider à dépasser ces limites et de favoriser ainsi le remaniement parodontal tout en préservant l'intégrité de la dent. Le parodonte est un système complexe composé de trois tissus : le cément sur la surface dentaire, le ligament parodontal contenant des fibres de collagène et l'os alvéolaire. Au cours des mouvements dentaires, la compression de ces tissus parodontaux entraîne une résorption radiculaire et éventuellement la formation de cément réparateur. Cependant, lorsque l'intégrité du parodonte n'est pas rétablie, la résorption radiculaire devient un effet secondaire indésirable et actuellement inévitable dont les causes sont mal connues. Cette résorption se traduit par une destruction du cément et/ou de la dentine, deux tissus calcifiés constituant la racine dentaire. Les progrès dans la

connaissance de la physiologie des tissus minéralisés ont permis de trouver de nouvelles techniques permettant non seulement de contrôler la réparation tissulaire mais de régénérer également les tissus lésés. Cette nouvelle approche de traitement, appelée le « biomimétisme », définit les innovations inspirées par la nature. L'efficacité de cette approche est désormais reconnue dans le traitement des parodontites qui s'accompagnent d'une destruction des tissus parodontaux, alors pourquoi ne pas l'appliquer en orthodontie? Pour mettre en oeuvre ce concept, il faudrait approfondir les connaissances des mécanismes impliqués dans le développement dentaire et c'est dans cette optique que nous avons mené notre étude. La régénération des tissus parodontaux détruits implique la reproduction des différents événements intervenant au cours du développement de ces tissus qui ne constituent pas seulement une unité fonctionnelle mais également une unité de développement d'origine dentaire où les formations de cément et de dentine sont étroitement liées. La physiologie de ces tissus est bien documentée mais l'origine des cellules responsables de la production du cément reste controversée. La théorie classique soutient que l'origine de ces cellules est ectomésenchymateuse, cependant la littérature suggère de plus en plus que les cémentoblastes proviennent de cellules épithéliales. D'ailleurs, un modèle d'inflammation pulpaire a été proposé (Hamamoto *et al.*, 1989a), permettant de stimuler la production de cément par les cellules épithéliales (restes épithéliaux de

Malassez) ainsi que la formation d'une matrice de dentine réparatrice. Le but de la présente étude était donc de caractériser la réponse des tissus minéralisés radiculaires, suite à une inflammation pulpaire, par immunocytochimie à l'or colloïdal, permettant d'étudier la distribution des différentes protéines de la matrice extracellulaire. La description des mécanismes biologiques impliqués dans la réparation des tissus s'avèrerait fort utile non seulement dans le contrôle des événements se déroulant au cours des mouvements dentaires, mais aussi dans la compréhension, la prévention voire la réparation de la résorption radiculaire.

R E V U E   D E  
L A  
L I T T É R A T U R E

## 2. REVUE DE LA LITTÉRATURE

### 2.1. Généralités

Les tissus calcifiés des vertébrés partagent des similarités fondamentales dans leur structure et leur formation. Ils contiennent tous des protéines de la matrice extracellulaire qui vont organiser les ions calcium et phosphate en une phase minérale structurée. La matrice organique des tissus minéralisés (os, dentine, ciment) est généralement constituée d'un riche réseau de fibres collagéniques de type I et une variété de protéines non collagéniques (PNCs), à l'exception de l'émail dentaire et du ciment acellulaire afibrillaire qui sont dépourvus de collagène. Les caractéristiques des composants matriciels se retrouvent dans tous les tissus calcifiés à base de collagène excepté dans le cartilage qui contient du collagène de type II, IX et X ainsi que des protéoglycanes (Boskey, 1996). Au niveau de l'organe dentaire, on retrouve trois tissus minéralisés : la dentine, l'émail et le ciment. Alors que l'origine de la dentine et de l'émail est bien connue, celle du ciment est moins claire. Bien que la théorie classique soutienne que les cémentoblastes se différencient à partir des cellules du follicule dentaire, qui dérivent de la crête neurale (revue dans Cho et Garant, 1996), une origine épithéliale est de plus en plus suggérée dans la littérature. C'est ainsi que Hamamoto *et al.* (1989a) ont proposé un modèle inflammatoire stimulant les cellules épithéliales, et en particulier les restes épithéliaux de



Malassez, qui secrèteraient une matrice cémentaire. Seconde observation particulièrement intéressante, ce même modèle d'inflammation pulpaire a permis la formation de dentine réparatrice, tissu réactionnel dont la structure et l'origine restent mal définies. Afin de pouvoir comprendre ces phénomènes et leurs implications biologiques, un rappel des connaissances actuelles relatives à la biologie cellulaire de la formation de l'organe dentaire en général, et de la racine en particulier, s'impose.

## **2.2. La formation de l'organe dentaire**

Dans la formation de l'organe dentaire, les cellules ectodermiques de la crête neurale migrent dans le mésenchyme le long de l'épithélium buccal. Ces cellules, dites ectomésenchymateuses, induisent la formation de la lame dentaire qui s'enfonce dans le tissu conjonctif sous-jacent où elle prend la forme de la future arcade dentaire. Par la suite, des épaisissements correspondant aux bourgeons des dents primaires, apparaissent sur la face externe de la lame dentaire (Ten Cate, 1998).

Chaque espèce possède une dentition qui lui est spécifique tout en respectant le patron de la couronne dentaire et la position des dents au sein des mâchoires. À chaque étape du développement dentaire, l'épithélium et le mésenchyme s'envoient des signaux afin de coordonner leur développement

respectif de façon précise et guident ainsi à tour de rôle la formation de l'organe dentaire (Maas et Bei, 1997). Ces interactions épithélio-mésenchymateuses représentent un mécanisme de contrôle local qui régule le développement de la majorité des organes et particulièrement les organes épidermiques tels les dents, les follicules pileux et les glandes mammaires. Fait intéressant, le développement morphologique initial de ces organes est semblable (Dassule et McMahon, 1998). Cependant, les mécanismes moléculaires ainsi que les signaux impliqués dans ces interactions font l'objet de nombreuses études (Heikinheimo *et al.*, 1998).

L'organe dentaire se compose de trois tissus : l'organe amélaire, la papille dentaire et le sac folliculaire qui enveloppe les deux précédents composants. Alors que l'organe amélaire est constitué de cellules épithéliales, la papille dentaire et le sac folliculaire sont formés de cellules ectomésenchymateuses, qui dérivent de la crête neurale. L'interaction entre ces deux types de cellules est fondamentale pour l'initiation et la formation dentaires (Thesleff *et al.*, 1996) et va permettre aux cellules de l'épithélium adamantin interne (organe de l'émail) de se différencier en améloblastes, tandis que quelques cellules de la papille dentaire se différencient en odontoblastes d'origine. À leur interface respective, ces cellules vont déposer la matrice organique de l'émail et de la dentine.

Le développement radiculaire ne se déclenche qu'à partir du moment où la couronne atteint sa taille finale. Les couches cellulaires internes et externes de l'épithélium adamantin, qui délimitent l'organe de l'émail, prolifèrent alors en direction apicale dans le tissu conjonctif sous-jacent pour former la gaine épithéliale de Hertwig (GEH) (Diamond et Applebaum, 1942), responsable de la formation des racines. Au fur et à mesure que la GEH s'accroît, elle enveloppe une condensation de tissus ectomésenchymateux. Elle va alors induire la différenciation des odontoblastes à la surface de ce tissu et la formation de la première couche de prédentine qui se minéralise rapidement (Ten Cate, 1998). Certains auteurs (Slavkin et Boyde, 1974) ont également proposé que la GEH joue un rôle direct dans l'induction et la formation du ciment (Slavkin, 1976).

### **2.3. L'énigme des restes épithéliaux de Malassez**

Au cours de la formation de la racine, la gaine épithéliale de Hertwig se fragmente pour permettre une interaction entre la dentine et les cellules ectomésenchymateuses du follicule dentaire. Il est largement admis aujourd'hui que ce phénomène est à l'origine de la différenciation des cimentoblastes à partir des cellules du follicule dentaire. La littérature n'est cependant pas claire concernant le devenir de ces cellules. Sur les molaires de

rat, certaines cellules se retrouvent emprisonnées entre la dentine et le ciment (Paynter et Pudy, 1958; Diab et Stallard, 1965; Lester, 1969; Jande et Bélanger, 1970; Alatli *et al.*, 1996; Bosshardt *et al.*, 1998). D'autres cellules vont former un réseau de cellules épithéliales qui vont persister dans le ligament parodontal. Ces cellules, appelées restes épithéliaux de Malassez, ont été décrites pour la première fois par Serres en 1817 bien que le crédit de cette découverte revienne à Malassez (1885). La persistance de ces cellules au sein du ligament intrigue beaucoup d'auteurs qui leur attribuent un potentiel rôle fonctionnel. Bien que leur nombre décroît avec l'âge (Wesselink et Beertsen, 1993), une activité cellulaire mitotique a cependant été observée (Grupe *et al.*, 1967; Kvam et Gilhuus-Moe, 1970) qui serait influencée par certains stimuli tels le mouvement dentaire orthodontique (Gilhuus-Moe et Kvam, 1972) et l'inflammation pulpaire (Hamamoto *et al.*, 1989a). L'analyse ultrastructurale révèle que ces cellules contiennent tous les composants nécessaires pour répondre aux demandes fonctionnelles liées aux altérations environnementales (Valderhaug et Nylén, 1966; Hamamoto *et al.*, 1989b). Plusieurs auteurs attribuent ainsi à ces restes épithéliaux des fonctions de protection de la surface radiculaire contre la résorption et l'ankylose et donc le maintien de l'intégrité du ligament parodontal (Løe et Waerhaug, 1961; Spouge, 1980; Lindskog *et al.*, 1988). Le mouvement orthodontique semble en effet influencer la fonction de ces cellules (Wentz *et al.*, 1950; Reitan, 1961;

Gilhuus-Moe et Kvam, 1972) qui sont présentes dans les sites de réparation de la résorption radiculaire provoquée lorsque les dents servent d'ancrage pour une expansion maxillaire rapide (Brice *et al.*, 1991). Si ces cellules possèdent effectivement une fonction potentielle, elle n'a pourtant jamais été démontrée et demeure un mystère.

#### **2.4. La dentine**

La formation de la dentine débute par la sécrétion d'une matrice extracellulaire fibrillaire de prédentine par les odontoblastes, cellules sécrétrices hautement polarisées. Les granules de sécrétion spécifiques, provenant de l'appareil de Golgi, sont transportés vers le prolongement odontoblastique, le pôle sécrétoire de la cellule. Au fur et à mesure de la sécrétion, le corps cellulaire odontoblastique s'éloigne de la matrice, le prolongement odontoblastique s'allonge et reste « emprisonné » dans la dentine.

La minéralisation de la dentine débute en relation avec les vésicules matricielles de l'odontoblaste. Elles sont riches en calcium et en phosphate et contiennent une enzyme capable de catalyser l'hydrolyse du phosphate inorganique; la phosphatase alcaline. Les premiers cristaux d'hydroxyapatite de la dentine se formeraient à l'intérieur de ces vésicules en relation avec les lipides membranaires. Ce phénomène encouragerait le dépôt de minéraux et la

production d'îlots globulaires de minéralisation. Les cristaux de carbonates apatites se déposent alors à l'intérieur et autour des fibrilles collagéniques. Il est généralement admis que la matrice protéique dentinaire joue un rôle dans ce processus de minéralisation (revue dans Butler, 1998).

#### **2.4.1. La dentine physiologique**

La prédentine tapisse la surface pulpaire de la dentine. Il s'agit d'une matrice dentinaire non minéralisée qui contient principalement des fibres de collagène, des glycoprotéines et des protéoglycanes. La prédentine est plus épaisse dans les sites de dentinogenèse active et a un rôle important dans le maintien de l'intégrité de la dentine (Ten Cate, 1998).

On peut distinguer plusieurs types de dentine. La dentine primaire constitue de loin la partie la plus volumineuse de la dentine et est produite à un taux relativement élevé tout au long de la formation radiculaire. La première couche de dentine primaire déposée est appelée manteau dentinaire. Sa formation, en regard de la couche interne épithéliale de Hertwig, précède sur son versant externe celle de la couche de ciment acellulaire. La dentine circumpulpaire sous-jacente constitue le reste de la dentine primaire. La dentine primaire est très volumineuse et résulte de la transformation graduelle

de la prédentine en dentine. Elle est parcourue par des canalicules dentinaires contenant les prolongements odontoblastiques (Linde et Goldberg, 1993).

Après la mise en fonction de la dent, la dentine secondaire est produite, à un taux plus faible, pendant toute la vie des odontoblastes, de façon physiologique, le long des parois pulpaire de la dentine primaire.

#### **2.4.2. La dentine réparatrice**

La dentine réparatrice est généralement élaborée en réponse à un stimulus externe (trauma mécanique, physique ou chimique ou par la carie). Ce type de dentine est déposé à l'interface dentine-pulpe, directement sous le trajet des tubuli affectés. Contrairement aux dentines primaire et secondaire qui sont formées le long de la paroi pulpo-dentinaire, la dentine réparatrice est uniquement élaborée par les cellules affectées directement par le stimulus. Elle peut comporter soit des tubuli dentinaires réguliers en continuité avec la dentine secondaire, soit des tubuli irréguliers en nombre et en forme ou pas de tubuli. Les cellules produisant ce type de dentine peuvent tapisser la surface de celle-ci ou être incluses dans la matrice dentinaire et dans ce cas, on parle d'ostéodentine à cause de sa ressemblance avec l'os observé en microscopie optique (Ten Cate, 1998).

Il existe deux types de dentine de réparation (Smith *et al.*, 1994) : (1) la dentine réactionnelle synthétisée par les odontoblastes pré-existants, (2) la dentinogenèse réparatrice caractérisée par la sécrétion d'une matrice tubulaire par des cellules polarisées ressemblant à des odontoblastes. La nature du stimulus responsable de la formation de ces deux types de dentine est la même mais son intensité, probablement plus importante dans le cas de la dentinogenèse réparatrice, entraînerait la mort de la population d'odontoblastes et la différenciation d'une nouvelle génération de cellules de type odontoblaste à partir de précurseurs cellulaires situés à l'intérieur de la pulpe.

## **2.5. Le ciment**

Le ciment a été reconnu comme partie intégrante de la dent dès 1835 (Schroeder, 1986). Il s'agit d'un tissu conjonctif minéralisé hautement spécialisé qui recouvre principalement la racine et protège ainsi l'intégrité de la surface radiculaire. Le ciment ancre la dent à l'alvéole dentaire par l'intermédiaire des fibres de collagène principales du ligament parodontal dont les extrémités emprisonnées dans l'os et le ciment sont appelées fibres de Sharpey. Le ciment fournit non seulement le support fonctionnel de la dent, mais il représente également un constituant majeur dans l'éruption dentaire et permet de garder la dent en occlusion en compensant par une apposition



continue. En outre, il permet à la dent de se déplacer dans n'importe quelle direction et particulièrement dans le sens horizontal. Contrairement à l'os, le cément n'est pas vascularisé et ne subit pas de renouvellement cellulaire. Cependant, il s'agit d'un élément adaptatif et réparateur (Bosshardt et Selvig, 1997) qui a la capacité de répondre aux différentes demandes fonctionnelles par un phénomène d'apposition-résorption notamment lors des mouvements orthodontiques (Schroeder, 1986).

Le cément est un tissu calcifié non uniforme. On trouve plusieurs types de cément sur la dent humaine selon la localisation, la structure, la fonction, le taux de formation et le degré de minéralisation (Bosshardt et Schroeder, 1996). Bien que la morphogenèse et la structure des différents types de cément soient bien documentées, la cémentogenèse, en terme de biologie cellulaire, reste peu connue. Les mécanismes de différenciation des cellules cémentoprogénitrices ainsi que les dynamiques cellulaires pendant le développement normal, la réparation et la régénération des tissus n'ont pas encore été démontrés.

### **2.5.1. Les différents types de cément**

Basé sur la présence ou non de cellules emprisonnées (cémentocytes) au sein de la matrice cémentaire, sur sa composition, l'origine et la direction des fibres collagéniques, on distingue différents types de cément (Listgarten et Kamin,

1969; Jones, 1981). (1) Le ciment acellulaire avec des fibres extrinsèques (CAFE) est composé de faisceaux de fibres de Sharpey dans une substance fondamentale dépourvue de cellules. Il recouvre du 1/3 aux 2/3 cervicaux de la racine de dents humaines; (2) Le ciment acellulaire afibrillaire (CAA) est dépourvu de fibres et de cellules. Il recouvre de petites régions de l'émail, le long de la jonction énamo-cémentaire chez les humains; (3) Le ciment cellulaire avec des fibres intrinsèques (CCFI) contient des cellules et des fibres de collagène qui ne s'étendent pas dans le ligament parodontal. C'est un tissu que l'on retrouve généralement au niveau des furcations radiculaires et dans la portion apicale. Il constitue également le tissu de réparation après une résorption radiculaire; (4) Le ciment cellulaire mixte stratifié (CCMS) est composé d'une alternance de couches de CAFE et de CCFI. On le retrouve principalement au niveau du 1/3 apical de la racine et des furcations radiculaires (Bosshardt et Schroeder, 1996).

La grande variété dans la morphologie et la distribution des différents types de ciment laisse supposer que leur formation est induite de différentes façons.

### **2.5.2. La jonction dentino-cémentaire**

La jonction dentino-cémentaire reste une région très mal définie probablement à cause des nombreuses observations réalisées à des stades de formation

radiculaire variés et sur des espèces différentes. La différenciation des cémentoblastes et la formation de la jonction dentino-cémentaire sont étroitement liés à la formation de la dentine sur le plan temporel et spatial. Chez le rat, dont le développement dentaire est très rapide, cette jonction serait occupée, dans sa partie cervicale, par une couche de ciment intermédiaire, alors que la formation plus lente de la dent humaine permet un imbriquement des fibres de collagène et de ciment à ce niveau.

Historiquement, deux tissus distincts ont été décrits au niveau de l'interface dentino-cémentaire, la couche hyaline de Hopewell-Smith et le ciment intermédiaire.

### **2.5.3. La couche hyaline de Hopewell-Smith**

Hopewell-Smith (1903) a décrit pour la première fois sur les dents humaines une couche hyaline recouvrant la surface de la dentine radiculaire. Elle recouvre la racine à partir de la jonction énamo-cémentaire jusqu'au tiers apical sur les dents monoradiculées. Cette couche est décrite comme une variation de la dentine permettant de sceller l'extrémité des tubuli dentinaires. Qu'en est-il alors des tubuli situés dans le tiers apical de la racine?

#### 2.5.4. Le ciment intermédiaire

Le terme « ciment intermédiaire » a été originellement décrit par Bödecker en 1878, puis défini par Bencze, en 1927, et Blackwood en 1957 (revue Harrison et Roda, 1995). Il correspondait à une variation du ciment ou de la dentine contenant des débris cellulaires de la gaine épithéliale de Hertwig (Wentz *et al.*, 1950; Lester, 1969) et serait formé vers la fin de la formation radiculaire dans la région la plus apicale de certaines dents humaines.

Plus récemment, cette appellation a été reprise et redéfinie par de nombreux auteurs pour désigner cette fois une couche située entre la dentine et le ciment. Ce tissu a été observé au niveau cervical, entre la dentine et le CAFE, sur les dents animales et particulièrement celles de rongeurs (Paynter et Pudy, 1958; Selvig, 1964; Lester, 1969; Owens, 1980; Yamamoto, 1986; Yamamoto et Wakita, 1990). Bien que cette couche n'ait pu être mise en évidence sur les dents humaines (Bosshardt et Schroeder, 1991) et que sa localisation soit limitée à la partie cervicale de la racine, sa nature a fait l'objet de nombreuses interprétations à travers les années. Certains auteurs ont suggéré qu'il s'agirait soit de la couche la plus profonde de ciment acellulaire sécrétée par la gaine épithéliale de Hertwig (Kronfeld, 1938; Paynter et Pudy, 1958), soit de la couche la plus superficielle de la dentine (Lester, 1969; Owens, 1978; Ten Cate, 1978). L'origine de ce tissu est également controversée. Il serait formé

soit par les cémentoblastes (Schroeder, 1986; Yamamoto, 1986; Cho et Garant, 1989), soit par les cellules de la gaine épithéliale de Hertwig (Paynter et Pudy, 1958; Owens, 1980; Slavkin *et al.*, 1989b).

Une des interprétations, qui retient actuellement l'attention, suggère que cette couche représente une accumulation de produits épithéliaux, sécrétés par la gaine épithéliale de Hertwig, et impliqués dans les interactions épithélio-mésenchymateuses au cours de l'initiation de la racine. Slavkin *et al.* (1989a) ont en effet détecté la présence de protéines de type amélaire dans la première couche de ciment acellulaire déposée à la jonction dentino-cémentaire de molaires de rat.

Yamamoto et Wakita (1990), qui ont également caractérisé la première couche tissulaire déposée sur la surface de dentine radiculaire, ont observé la présence de fibres de collagène et de protéoglycanes qui vont médier l'attachement initial des fibres principales du ciment sur la dentine. Les fibres de collagène du ciment s'entremêlent tellement avec celles de la dentine qu'il devient alors difficile d'identifier la frontière entre ces deux tissus. Néanmoins, la condensation de ces fibres ainsi que la concentration de protéines non collagéniques (PNCs) entre celles-ci peuvent donner l'impression de l'existence d'une couche entre ces deux tissus (Bosshardt et Schroeder, 1996)

mais aucune étude n'a démontré à ce jour la présence d'une couche de ciment intermédiaire entre la dentine et le ciment.

### **2.5.5. Les cémentoblastes**

Il apparaît de plus en plus que les cémentoblastes impliqués dans la formation du ciment acellulaire et ceux associés au ciment cellulaire sont différents. Plusieurs études viennent appuyer ce point : (1) aucune des cellules observées dans le développement de ciment acellulaire n'est semblable en taille et en forme aux cémentoblastes associés avec la formation de ciment cellulaire (Bosshardt et Schroeder, 1996); (2) le comportement des cellules du follicule dentaire est différent dans la cémentogenèse cellulaire et acellulaire et résulte en un arrangement fibrillaire différent entre les deux types de ciment. (Yamamoto *et al.*, 1994; Bosshardt et Schroeder, 1996); (3) il existe des différences phénotypiques entre les cémentoblastes associés au ciment acellulaire et ceux du ciment cellulaire (Bronckers *et al.*, 1994; Tenorio *et al.*, 1993).

#### **2.5.5.1. La différenciation des cémentoblastes**

La théorie classique affirme que les cémentoblastes du ciment acellulaire se différencient à partir des cellules du follicule dentaire, d'origine ectomésenchymateuse (dérivant des cellules de la crête neurale) (revue dans

Cho et Garant, 1996). Cependant, la nature et l'origine des molécules impliquées dans la différenciation des cémentoblastes ne sont pas connues.

Plusieurs éventualités ont été suggérées dont l'une des plus répétées, mais jamais démontrée, est l'implication des cellules de la gaine épithéliale de Hertwig (GEH), ou de leurs produits, dans la différenciation des cémentoblastes, par analogie avec l'interaction épithélio-mésenchymateuse entre la GEH et la différenciation des odontoblastes (Thomas et Kollar, 1989).

Un groupe de protéines immunologiquement liées aux protéines amélaire ont été proposées pour intervenir dans la cémentogenèse initiale (Glazman et Slavkin, 1974; Slavkin, 1976). Ces protéines sont présentes sur la surface radiculaire cervicale des molaires et sur la surface analogue à la racine des lapins et des souris (Slavkin et Boyde, 1974). Les observations convergent pour affirmer qu'après la différenciation des odontoblastes et l'apposition initiale de dentine radiculaire, les cellules internes de la gaine épithéliale de Hertwig développent les constituants nécessaires à la sécrétion (Owens, 1978; 1980). Toutefois, la présence de ces protéines de type amélaire au sein de la première couche de ciment déposée (Slavkin *et al.*, 1989a) ne suggère pas forcément une implication directe de ces protéines dans l'initiation de la cémentogenèse. De plus, leur rôle -s'il existe- n'a toujours pas été clarifié.

Certaines protéines de la matrice extracellulaire (MEC), les protéines non collagéniques (PNCs) osseuses, ont été également proposées pour la différenciation des cémentoblastes. La sialoprotéine osseuse (BSP) est présente sur la surface radiculaire de molaires de souris en formation (MacNeil *et al.*, 1994) et a été proposée pour la chémo-attraction et l'adhésion des précémentoblastes sur la racine ainsi que la différenciation cellulaire. Cependant, cette étude immunohistochimique ne permet pas de déterminer si la présence de ces PNCs n'est pas plutôt liée au processus de minéralisation de la dentine et du ciment.

#### 2.5.5.2. Transformation épithélio-mésenchymateuse?

Bien que les cellules épithéliales semblent participer à la cémentogenèse initiale (Paynter et Pudy, 1958; Slavkin, 1976; Owens, 1978; 1980; Lindskog et Hammaström, 1982; Glazman *et al.*, 1986; Slavkin *et al.*, 1989b; Bosshardt et Nanci, 1998), il ne s'agirait que d'un phénomène transitoire puisque seules les cellules mésenchymateuses sont retrouvées sur la surface radiculaire du ciment en formation durant les stades de développement plus avancés (Bosshardt et Nanci, 1997). L'origine de ces cellules mésenchymateuses reste floue. Elles proviendraient soit de la différenciation des cellules ectomésenchymateuses du follicule dentaire en cémentoblastes qui vont déposer le ciment propre (revue dans Cho et Garant, 1996), soit des cellules



de la gaine épithéliale de Hertwig qui subiraient une transformation épithélio-mésenchymateuse (TEM) pour donner naissance aux cémentoblastes (Thomas et Kollar, 1988; MacNeil et Thomas, 1993; Bosshardt et Schroeder, 1996; Bosshardt et Nanci, 1997; 1998). Thomas (1995) a montré que ce phénomène est possible *in vitro*. Bien que l'évidence d'une telle transformation n'ait pas encore été montrée au niveau de la formation de l'organe dentaire, il s'agit cependant d'un processus fondamental dans le développement embryonnaire (revue dans Hay, 1995).

Le premier exemple de transformation épithélio-mésenchymateuse se produit au cours du développement embryonnaire par la formation du troisième feuillet germinatif, le mésoderme (ou mésenchyme primaire), à partir de l'épithélium épiblaste (ou ectoderme primitif). L'apparition de ce feuillet marque le début d'une phase décisive du développement embryonnaire, la gastrulation, où l'on retrouve la présence des trois feuillets germinatifs (ectoderme, endoderme, mésoderme). Pour la première fois dans le développement, certaines cellules destinées à former l'embryon propre, subissent un changement fondamental dans l'organisation et la forme cellulaire d'une conformation épithéliale (ou polarisée) à une conformation mésenchymateuse (ou non polarisée). Cet événement est commun dans le développement de toutes les espèces animales des invertébrés jusqu'aux

mammifères, et forme ainsi une des liaisons intéressantes dans la biologie développementale comparative (Viebahn, 1995). Ces cellules mésenchymateuses ont un avantage par rapport aux cellules épithéliales, à savoir la capacité de se déplacer à travers la matrice extracellulaire (MEC) créée par les cellules épithéliales et mésenchymateuses. Chez les vertébrés, une fois que les cellules mésenchymateuses dérivant du mésoderme atteignent leur destination, elles peuvent se différencier en cellules qui vont sécréter une grande quantité de MEC créant ainsi l'endosquelette comme le cartilage et les os.

Un autre exemple particulièrement intéressant apparaît au cours de la formation du tube neural. Les cellules de la crête neurale s'échappent de l'épithélium constituant la surface supérieure du tube puis migrent pour former une variété de cellules et de tissus au sein de l'embryon. C'est ainsi que les cellules de la crête neurale migrent dans le complexe crânio-facial et se différencient en cellules spécifiques telles que les ostéoblastes, les odontoblastes et les chondroblastes qui vont former respectivement des tissus mésenchymateux osseux, dentinaires, et cartilagineux.

Cette transformation épithélio-mésenchymateuse (TEM) se retrouve au niveau de l'embryon plus âgé lors de la formation du palais secondaire. Les

expériences de Fitchett et Hay (1989) et de Griffith et Hay (1992) montrent en effet la TEM de l'épithélium situé sur les bords médians du palais secondaire en mésenchyme après la fusion des deux processus palatins latéraux sur la ligne médiane. Il existe une certaine analogie entre ce processus et une éventuelle TEM des cellules de la gaine épithéliale de Hertwig puisque les cellules épithéliales situées sur la ligne médiane du palais secondaire appartiennent à l'épithélium oral et que les cellules mésenchymateuses sous-jacentes proviendraient de la crête neurale.

Contrairement aux cellules dérivant de l'épithélium neural, les cellules de l'épithélium oral qui participent à la formation de la couronne dentaire, maintiennent leur phénotype épithélial. Les cellules de l'épithélium adamantin interne ne migrent pas et produisent une matrice extracellulaire *in situ*. Les cellules progénitrices de l'os de la région crâniofaciale et de la dentine proviennent de la crête neurale et subissent une transformation épithélio-mésenchymateuse (TEM) précoce pour migrer dans leur site d'activité. De la même façon, les cellules de la gaine épithéliale de Hertwig (GEH) qui dérivent de l'organe amélaire, et qui jouent un rôle au cours de la formation radiculaire, pourraient également subir une TEM tardive pour donner naissance aux cémentoblastes associés avec le ciment fibrillaire extrinsèque (Bosshardt et Nanci, 1998). Ten Cate (1996) précise que cette transformation se produirait

uniquement de façon partielle du fait de la présence de quelques cellules de la GEH sous forme de restes épithéliaux de Malassez.

## **2.6. Les matrices extracellulaires des tissus minéralisés dentaires**

La dent représente un modèle composite biologique unique dans lequel la minéralisation des matrices extracellulaires collagéniques (dentine et cément radiculaire) et non collagéniques (émail et CAA) peuvent être étudiées. La matrice collagénique représente la plus grande composante de ces tissus. Outre son rôle de support structural qui influence les propriétés physiques du tissu, le collagène joue également un rôle inducteur dans l'apposition minérale et la disposition des petits cristaux d'apatite (Glimcher, 1989). De plus, le patron d'expression du collagène va déterminer celui des protéines non collagéniques (PNCs), autres constituants des tissus calcifiés (Bosshardt *et al.*, 1998; Nanci, 1999). Cependant, malgré sa prédominance dans ces tissus, le collagène n'est pas le déterminant majeur de la nucléation, de la croissance et de la forme définitive des cristaux d'apatite. Plusieurs études convergent pour affirmer le rôle prépondérant des PNCs dans ces différents événements. Ces protéines sont multifonctionnelles et régulent notamment la formation et la croissance des cristaux d'hydroxyapatite, en médiant à la fois les événements cellulaires et matriciels.

Les composants de la matrice organique déterminent la structure et les propriétés biomécaniques des tissus. Alors que l'ultrastructure du collagène de l'organe dentaire, composé de stries régulières, est facilement reconnaissable, les différentes PNCs ne possèdent pas de structure propre. L'immunocytochimie est une forme de biochimie sur coupe qui permet de corréler la composition du tissu avec sa structure et de détecter la présence de chaque PNC. Il apparaît donc important d'étudier l'expression et la distribution de ces PNCs afin de comprendre leurs fonctions (Nanci *et al.*, 1998). Nous allons passer en revue les différentes protéines matricielles que l'on retrouve au niveau de la racine.

### **2.6.1. Les protéines de la matrice osseuse**

Parmi les principales protéines non collagéniques de la matrice extracellulaire de l'os et du ciment, on retrouve plusieurs glycoprotéines qui sont exprimées par des cellules ayant un phénotype mésenchymateux, telles que les odontoblastes et les cémentoblastes. On peut citer la sialoprotéine osseuse (BSP), l'ostéopontine (OPN), l'ostéonectine, la fibronectine, la ténascine. De plus, on peut noter la présence de protéoglycanes et de l'ostéocalcine, également présente dans la dentine (Gehron Robey, 1996). Nous allons particulièrement nous attarder sur la BSP et l'OPN, deux principales protéines

multifonctionnelles que l'on retrouve associées à la formation de ciment au niveau des sites de réparation après exposition de la dentine radiculaire (Kawaguchi *et al.*, 1995).

#### 2.6.1.1. L'ostéopontine (OPN)

L'ostéopontine est une phosphoprotéine que l'on croyait originellement spécifique et unique à l'os, alors qu'elle est présente dans d'autres tissus calcifiés comme la dentine et le ciment (McKee *et al.*, 1996). Cependant, cette protéine n'est pas spécifique aux tissus minéralisés, on la retrouve dans de nombreux tissus non minéralisés aussi bien dans le parodonte (MacNeil *et al.*, 1995) que dans le système vasculaire, le système immunitaire, les cancers et le rein ou dans des tissus pathologiquement minéralisés, produits principalement par les cellules épithéliales (Bellahcène et Castronovo, 1995). L'OPN est maintenant considérée comme un important marqueur de la transformation néoplasique (Wu *et al.*, 2000). Elle est particulièrement exprimée dans les sites inflammatoires où son rôle contradictoire à la fois pro- et anti-inflammatoire alimente les débats au sujet de son mécanisme d'action (Denhardt *et al.*, 2001). Elle possède une séquence Arginine-Glycine-Aspartate (RGD) qui permet à la protéine de médier l'attachement, la migration et la signalisation cellulaires. Au sein des tissus calcifiés, l'OPN régule la formation du cristal d'hydroxyapatite et la croissance des cristaux pré-existants. L'accumulation

d'OPN apparaît entre les fibrilles de collagène et pourrait servir de guide pour stabiliser le patron de minéralisation interfibrillaire à l'intérieur du tissu (revue de Sodek *et al.*, 2000).

#### 2.6.1.2. La sialoprotéine osseuse (BSP)

La BSP est une phosphoprotéine hautement glycosylée et sulfatée, que l'on retrouve essentiellement dans les tissus minéralisés. Elle possède des propriétés physico-chimiques d'un nucléateur d'hydroxyapatite d'autant que son expression spatio-temporelle coïncide avec l'initiation de la formation de l'os et du ciment (revue dans Ganss *et al.*, 1999). D'autre part, elle possède également une séquence RGD qui confère à la protéine des propriétés de signalisation et d'adhésion cellulaires. De la même façon que pour l'ostéopontine, la BSP est généralement associée avec les tissus minéralisés conjonctifs comme le ciment et la dentine, mais son ARNm se retrouverait également dans les améloblastes au cours de la formation dentaire (Chen *et al.*, 1998) et dans les lésions cancéreuses mammaires humaines (Bellahcène et Castronovo, 1997).

Au vue de ces données, il apparaît déjà que la sialoprotéine osseuse et l'ostéopontine ne sont pas exprimées uniquement par les cellules mésenchymateuses mais également par les cellules épithéliales et ne doivent

donc pas être considérées comme les marqueurs exclusifs des cellules d'origine mésenchymateuses. Nous allons développer ce point un peu plus loin (voir paragraphe 6.4).

### **2.6.2. Les protéines amélares**

Contrairement aux tissus minéralisés mésenchymateux, l'émail est un produit épithélial dépourvu de collagène qui ne subit ni résorption ni remodelage. Sa matrice organique se compose exclusivement de protéines non collagéniques distinctes distribuées en deux grandes familles: les amélogénines et les non amélogénines. Bien que ces protéines soient structurellement différentes de celles de la matrice osseuse, elles semblent pourtant partager des similarités fonctionnelles (Nanci et Smith, 2000).

#### *2.6.2.1. Les amélogénines (AMEL)*

Les amélogénines constituent la principale famille de protéines de la matrice amélaire (90%). L'expression des amélogénines débute juste avant la minéralisation initiale de la dentine et se termine au stade de maturation initiale (Nanci et Smith, 1992). Pendant le stade de sécrétion, la masse d'amélogénines est partiellement dégradée en peptides de plus petite taille qui vont être ultérieurement éliminés afin de favoriser la croissance des cristaux. Cette fonction des amélogénines est semblable à celle des protéines non



collagéniques, comme l'ostéopontine qui inhibe la formation des cristaux. (Nanci et Smith, 2000). Les amélogénines existent sous plusieurs formes différentes qui constituent des agrégats supramoléculaires. Ces protéines sont très hydrophobes et riches en proline ce qui leur confère non seulement un rôle de support physique, mais elles fourniraient également un environnement favorable à l'apposition d'une phase minérale organisée, de la même manière que le collagène. Elles joueraient un rôle dans la formation amélaire en stabilisant les cristaux nouvellement formés puis en influençant leur croissance en volume. Les amélogénines sont restées remarquablement bien conservées au cours de l'évolution suggérant une grande importance fonctionnelle (Brookes *et al.*, 1995). Elles ont donc fait l'objet de nombreuses études et leurs caractéristiques structurelles sont bien documentées (revue dans Fincham *et al.*, 1999).

Récemment, l'attention s'est plutôt portée sur la seconde famille moins bien connues, les non amélogénines. Des protéines ont été identifiées et caractérisées telles l'énaméline (Fukae *et al.*, 1996; Hu *et al.*, 2000), la tuftéline, similaire aux fragments protéiques présents dans l'émail mature (Deutsch *et al.*, 1991), et l'améloblastine (Krebsbach *et al.*, 1996), également nommée améline (Cerny *et al.*, 1996; Fong *et al.*, 1996a, b) et "sheathlin" (Hu *et al.*, 1997). Une non amélogénine sulfatée a été également caractérisée par

Smith *et al.* (1995) qui suggèrent que certaines parties de cette protéine aient des poids moléculaires similaires aux formes fragmentées des protéines non collagéniques que l'on retrouve typiquement dans l'os.

#### 2.6.2.2. L'améline/ améloblastine (AMBN)

Cette protéine est riche en proline, leucine, glycine et en résidus d'alanine (Krebsbach *et al.*, 1996; Cerny *et al.*, 1996). Elles contiennent également des domaines peptidiques impliqués dans l'adhésion cellulaire. Elle a donc été proposée comme médiateur du contact des améloblastes sur la surface d'émail minéralisé (Cerny *et al.*, 1996) mais cette hypothèse a été réfutée par Brookes *et al.* (2001). L'ARNm pour l'AMBN est exprimé en grande proportion par les améloblastes sécréteurs et post-sécréteurs mais la protéine est éliminée au cours du stade de maturation. L'AMBN intacte semble s'accumuler préférentiellement dans les sites de croissance où elle participerait à l'élongation et/ou la promotion des cristaux et serait ensuite rapidement dégradée en plus petites molécules. Les fragments protéiques auraient des propriétés fonctionnelles différentes de la molécule « mère » (Nanci *et al.*, 1998).

### **2.6.3. Les cellules de la gaine épithéliale de Hertwig (GEH) sécrètent-elles des protéines amélaire ?**

Avant le début de la cémentogenèse, il semble que les cellules de la gaine épithéliale de Hertwig (GEH) sécrètent des protéines de type amélaire sur la surface radiculaire de molaires de souris en développement (Slavkin *et al.*, 1989a, b). Les cellules de la GEH contiennent en effet des organites suggérant leur activité sécrétoire (Owens, 1978; 1980). Plusieurs auteurs confirment ces résultats chez le singe (Lindskog, 1982 a, b; Lindskog et Hammarström, 1982). Bien que les cellules de la GEH n'expriment pas l'ARNm de l'amélogénine (AMEL), principale protéine amélaire, dans des conditions normales (Luo *et al.*, 1991; Bosshardt et Nanci, 1998), elles pourraient en produire dans des conditions pathologiques (Hamamoto *et al.*, 1996). De récents travaux ont également montré que les cellules de la GEH emprisonnées dans le ciment, situées sur la moitié et le tiers radiculaire apical, expriment l'ARNm de l'améloblastine (AMBN), mais pas celles situées dans le tiers cervical (Fong *et al.*, 1996a; Bosshardt et Nanci, 1998; Fong et Hammarström, 2000). En fait, il existe des différences dans la distribution des protéines amélaire exprimées par les cellules de la gaine épithéliale de Hertwig au cours du développement dentaire. Fong et Hammarström (2000) distinguent ainsi trois groupes de restes épithéliaux de Malassez au niveau du ciment cellulaire de molaires de rat complètement formées : (1) un groupe de cellules, n'exprimant que l'AMBN mais pas l'AMEL, emprisonnées dans la jonction cémento-dentinaire, (2) un

groupe de cellules épithéliales isolées situées dans la région apicale, partiellement ou complètement emprisonnées dans la périphérie du ciment cellulaire, n'exprimant ni l'une ni l'autre de ces protéines et, (3) un groupe de cellules exprimant à la fois l'AMBN et l'AMEL formant des îlots épithéliaux dans la région apicale. Le nombre des îlots augmente avec l'âge (Wentz *et al.*, 1950; Fong et Hammarström, 2000). C'est ce dernier groupe de cellules qui seraient stimulé par une inflammation pulpaire pour former le ciment cellulaire (Hamamoto *et al.*, 1989a). La fonction de ces différents groupes cellulaires reste à éclaircir.

#### **2.6.4. L'expression des protéines de la MEC est-elle spécifique?**

Les études sur les molaires de rongeurs montrent que les cellules bordant la racine au cours de la cémentogenèse sont associées avec des protéines typiques de la matrice mésenchymateuse, la sialoprotéine osseuse et l'ostéopontine, et semblent contribuer à l'apposition initiale de ciment (Sommer *et al.*, 1996; D'Errico *et al.*, 1997). Néanmoins, la première couche matricielle déposée le long de la dentine radiculaire se forme en présence de cellules épithéliales (Paynter et Pudy, 1958; Slavkin, 1976; Owens, 1978; 1980; Lindskog et Hammarström, 1982; Glazman *et al.*, 1986; Slavkin *et al.*, 1989a, b; Bosshardt et Nanci, 1998). Ces observations nous amènent à envisager deux possibilités

(1) soit les cellules épithéliales subissent une transformation épithélio-mésenchymateuse (voir paragraphe 5.3.1), (2) soit ce sont les cellules épithéliales qui sécrètent ces protéines typiques de la matrice mésenchymateuse. Comment est-ce possible puisqu'il existe une nette différence entre les matrices des tissus minéralisés amélaire et mésenchymateux? En effet, la plupart des protéines de la matrice amélaire disparaissent dans l'émail mature pour permettre la croissance en largeur finale des cristaux d'hydroxyapatite hautement organisés (Robinson *et al.*, 1995; Smith et Nanci, 1996), alors que les tissus minéralisés mésenchymateux présentent une grande quantité de matrice organique ainsi que des petits cristaux orientés de façon irrégulière. Au vue de ces différences structurales, les cellules épithéliales sont-elles effectivement capables de produire des produits mésenchymateux ?

Des éléments de réponse sont apportés par l'observation des divers tissus dentaires. Les caractéristiques des tissus mésenchymateux se retrouvent également dans une zone particulière des molaires de rongeurs, appelée *enamel-free area* (EFA), située sur la surface occlusale de la couronne. Il s'agit d'une matrice qui se forme exclusivement en présence de cellules épithéliales et contenant à la fois des protéines amélaire (amélogénine, améloblastine) (Nakamura *et al.*, 1991; Inai *et al.*, 1992; Bosshardt et Nanci,

1998) et des protéines cimentaires (sialoprotéine osseuse, ostéopontine) (Bosshardt et Nanci, 1997) ainsi que des fibres de collagène éparses (Bosshardt et Nanci, 1998). Les cellules épithéliales pourraient donc être impliquées dans l'apposition de protéines à la fois amélaire et mésenchymateuses typiques durant les stades initiaux de la formation de ciment, d'autant que les épithélia adamantins internes au niveau de l'EFA et le long de la racine présentent des aspects développementaux communs (Bosshardt et Nanci, 1997). De plus, au cours de l'odontogenèse, le gène de l'améloblastine serait exprimé à la fois par les cellules épithéliales et les cellules mésenchymateuses (Fong *et al.*, 1998).

Une autre matrice minéralisée a retenu l'attention. Il s'agit du ciment acellulaire afibrillaire (CAA) (Schroeder et Listgarten, 1977), un tissu riche en protéines non collagéniques retrouvées dans l'os (Bosshardt et Nanci, 1997), et déposé sur l'émail et la dentine dans la région cervicale de la racine. Au cours de la formation dentaire, le CAA est déposé sur la surface amélaire et est recouvert par les cellules de l'épithélium adamantin interne qui empêchent ainsi tout accès aux éventuelles cellules du follicule dentaire. Seules les cellules épithéliales sont donc responsables de la formation du CAA (Bosshardt et Nanci, 1997). De la même façon que pour la matrice de l'EFA, les cellules de l'épithélium adamantin interne, au moins dans la portion

cervicale de la dent, pourraient donc être stimulées et participer à la formation du ciment.

### **2.7. Contribution des connaissances actuelles sur la cémentogenèse et la régénération parodontale**

La destruction des tissus parodontaux (os alvéolaire, ligament parodontal, ciment) survenant lors d'une parodontite pose un problème du point de vue de la régénération des tissus. De nombreuses techniques de traitement sont apparues, basées sur la connaissance de la formation du parodonte, afin de rétablir de nouveaux tissus parodontaux avec un succès pour le moins variable. Parmi ces procédures, on peut citer les différents types de lambeaux, la régénération tissulaire guidée, les greffes osseuses ou de substituts osseux qui permettent certes une réparation. Cependant, la régénération parodontale, à savoir la restauration de la structure et de la fonction originelles des tissus parodontaux, reste difficile à obtenir (Gestrelius *et al.*, 2000). Le problème réside dans le type de ciment formé et de sa cohésion avec la dentine. En effet, le tissu calcifié, formé après ce type de traitement, contient souvent des cellules et se détache facilement de la dentine (Listgarten, 1972; Listgarten et Rosenberg, 1979; Nyman *et al.*, 1982; Caffesse *et al.*, 1991).

### 2.7.1. Utilisation d'extraits de matrice amélaire : rêve ou réalité?

Une autre approche de la régénération des tissus parodontaux a été proposée, basée sur le principe général de « biomimétisme » qui consiste à reproduire les événements se déroulant au cours du développement normal. Ce principe a donc été adopté en parodontie (Gestrelius *et al.*, 2000). Sachant que les tissus parodontaux contiennent des cellules ayant la capacité de régénérer le parodonte, les procédures cliniques se sont développées pour restaurer un support parodontal en promouvant de telles cellules afin qu'elles acquièrent la capacité de régénérer les tissus parodontaux (McCulloch, 1993; Pitaru *et al.*, 1994; Hammarström, 1997). Les candidats adéquats pour stimuler les cellules dans le site de cicatrisation sont les protéines, et particulièrement celles de la matrice extracellulaire. Basées sur la théorie de Glazman et Slavkin (1974) sur l'éventuelle implication des protéines amélaire dans la cémentogenèse initiale, des recherches ont été menées pour déterminer l'effet d'un extrait de matrice amélaire (*enamel matrix derivative* ou EMD), sur les cellules mésenchymateuses du follicule dentaire. Les résultats, très probants, ont confirmé la formation d'un tissu similaire au ciment acellulaire (CAFE) (Hammarström, 1997) associée à celle du ligament parodontal et de l'os alvéolaire (Hammarström *et al.*, 1997) puisque les développements de ces trois tissus sont étroitement liés (Ten Cate, 1975). Ces études suggèrent donc que les protéines amélaire aient la capacité de promouvoir une régénération



complète du parodonte. Cette régénération par « mimétisme » devient donc une option de traitement intéressante des destructions parodontales. Gestrelus *et al.* (1997a) ont alors mis sur le marché cet extrait, commercialisé par Biora Inc. sous l'appellation EMDOGAIN<sup>®</sup>. Son très faible potentiel immunogénique (Zetterström *et al.*, 1997) ainsi que son efficacité dans les lésions parodontales d'une dent humaine (Heijl *et al.*, 1997) ont suscité un réel engouement pour ce nouveau produit « miracle ».

L'EMD agirait sur les cellules mésenchymateuses du ligament parodontal mais pas sur les cellules épithéliales (Gestrelus *et al.*, 1997b), probablement par un mécanisme d'interaction cellule-matrice entre l'agrégat d'amélogénines et les cellules du ligament (Hammarström *et al.*, 1997). L'EMD permet notamment d'augmenter la prolifération et de modifier les activités des cémentoblastes et des ostéoblastes (Tokiyasu *et al.*, 2000) tout comme un facteur de croissance. Dans plusieurs études, l'EMD est utilisé comme synonyme d'amélogénine (AMEL). Zeichner-David (2001) a effectivement confirmé que l'AMEL possède la même action cellulaire ciblée que l'EMD, bien qu'il s'agisse d'un extrait pouvant contenir d'autres protéines amélares.

### **2.7.2. Efficacité clinique de EMDOGAIN®**

Plusieurs études ont été entreprises pour comparer l'efficacité de ce produit par rapport aux techniques conventionnelles. Il s'est avéré que les résultats obtenus ne sont pas aussi probants que la régénération tissulaire guidée et surtout pas prévisibles (revue de Zeichner-David, 2001). Plusieurs critiques peuvent être énoncées à l'égard de ces études dont beaucoup sont des rapports de cas et se basent essentiellement sur des évaluations cliniques et non histologiques. Des études rigoureuses s'imposent donc pour déterminer l'effet -s'il existe- de cette matrice de protéines amélaire sur le ciment.

## 2.8. Buts de l'étude

Depuis que des protéines de type amélaire ont été détectées sur la surface radiculaire linguale d'incisives de lapins et de souris par Glazman et Slavkin en 1974, de nombreuses hypothèses ont vu le jour concernant l'implication des cellules épithéliales dans la formation initiale de ciment. Cependant, la principale protéine amélaire, l'amélogénine (AMEL), n'est pas détectée pendant la formation radiculaire et les cellules de la gaine épithéliale de Hertwig (GEH) ne la synthétisent pas (Luo *et al.*, 1991; Bosshardt et Nanci, 1998; Fong et Hammarström, 2000) bien qu'elle semble agir sur la prolifération des cellules du ligament parodontal. Plusieurs hypothèses peuvent être proposées pour expliquer le fait que l'AMEL ne soit pas détectée: (1) soit elle est sécrétée en faibles quantités; (2) soit la sensibilité des techniques utilisées est insuffisante; (3) soit elle est produite de façon transitoire, avant la transformation épithélio-mésenchymateuse (TEM) des cellules de la GEH en cémentoblastes (Thomas et Kollar, 1988; MacNeil et Thomas, 1993; Bosshardt et Schroeder, 1996; Bosshardt et Nanci, 1997; 1998), et l'observation a lieu ultérieurement à cette sécrétion. Le fait que l'AMEL ne soit pas détectée au cours de la formation radiculaire physiologique n'exclut donc pas le fait qu'elle puisse être sécrétée. Seule l'étude immunohistochimique de Hamamoto *et al.* (1996) a rapporté la production d'AMEL par les restes épithéliaux de

Malassez, dérivant de la gaine épithéliale de Hertwig, mais uniquement sous des conditions pathologiques. Le modèle d'inflammation pulpaire utilisé a révélé non seulement la production d'une matrice cémentaire par ces mêmes cellules épithéliales entre le 7<sup>ème</sup> et le 14<sup>ème</sup> jour après la perforation de la chambre pulpaire mais également la formation de dentine réparatrice (Hamamoto *et al.*, 1989a). Peu d'études ont caractérisé la dentine réparatrice par microscopie électronique. De plus, sa composition ainsi que les cellules impliquées dans sa formation sont mal connues. Le but de la présente étude était donc de tirer avantage de ce modèle afin de mettre en évidence à la fois l'ultrastructure des matrices des tissus radiculaires de réparation, 11 jours après la perforation pulpaire, et de caractériser la présence et la distribution des différentes protéines non collagéniques (PNCs) au sein de ces tissus, par immunocytochimie à l'or colloïdal au microscope électronique à transmission. Les différentes composantes des tissus calcifiés sont difficilement dissociables mécaniquement, néanmoins il est possible d'associer la structure des tissus avec leur composition grâce à l'immunocytochimie, qui représente une forme de biochimie sur coupe. La distribution et le site d'accumulation des protéines est un indicateur de leurs fonctions. De plus, cette technique offre une résolution beaucoup plus importante que l'immunohistochimie par microscopie optique utilisée par Hamamoto *et al.* (1996). Nous avons donc choisi cette technique pour une meilleure compréhension des mécanismes

impliqués dans la formation des tissus minéralisés de réparation et de la fonction des principales protéines non collagéniques (PNCs) amélaire et osseuses au sein de ces tissus. Outre l'amélogénine, nous avons décidé de tester l'améloblastine, protéine associée à la formation radiculaire puisqu'elle est exprimée par les cellules de la gaine épithéliale de Hertwig, ainsi que deux PNCs fortement exprimées au sein des tissus mésenchymateux, l'ostéopontine et la sialoprotéine osseuse qui ont également été détectées par immunohistochimie au sein de la dentine réparatrice (Zhang *et al.*, 2000; Yoshida *et al.*, 2002).

Il nous est apparu intéressant d'observer la capacité de la dent à se réparer suite à une agression pulpaire, mais nous avons également souhaité caractériser les tissus de réparation afin de pouvoir déterminer les différents mécanismes impliqués dans ce processus. La réparation tissulaire est un objectif primordial dans tous les domaines de la médecine. Dans notre domaine restreint à l'organe dentaire, mais dont l'organisation complexe ne cesse de nous émerveiller, il devient alors intéressant de pouvoir contrôler les processus impliqués dans la réparation afin de prévenir la résorption radiculaire en orthodontie ou même faciliter les remaniements parodontaux au cours du déplacement dentaire. Ce contrôle peut également trouver de nombreuses applications dans toutes les autres spécialités de la dentisterie.

T E C H N I Q U E  
E X P É R I M E N T A L E

### 3. TECHNIQUE EXPÉRIMENTALE

Les rongeurs fournissent un modèle populaire pour l'étude du développement dentaire en général. En effet, ils présentent une grande similitude avec la dentogenèse humaine. La principale différence réside dans la vitesse de formation des tissus qui est beaucoup plus rapide chez les rats et les souris.

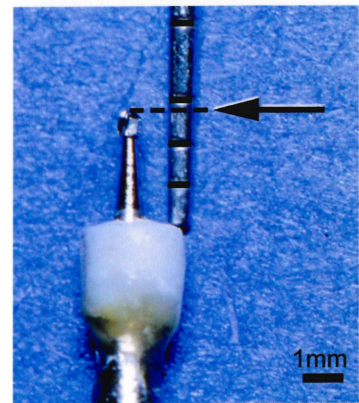
#### 3.1. Procédure chirurgicale

Toutes les procédures réalisées sur les animaux et les protocoles expérimentaux décrits ci-dessous ont été approuvés par le Comité de déontologie de l'expérimentation sur les animaux de l'Université de Montréal. Nous avons adapté le modèle expérimental décrit, de façon sommaire, par Hamamoto *et al.* (1996).

Vingt-deux rats Wistar pesant entre 100 et 160g (Charles River Canada; St-Constant, QC, Canada) sont utilisés pour l'expérimentation. Ces rats sont anesthésiés par injection intrapéritonéale (0.27ml/100g) d'un mélange d'Hypnorm<sup>®</sup> (fentanyl citrate et fluanisone; Janssen Pharmaceutica, Beerse, Belgique), Versed<sup>®</sup> (midazolam: Hoffmann-LaRoche Limited, Mississauga, ON, Canada) et d'eau distillée dans les proportions de 1:1:2.

Les ouvertures de chambre des première et deuxième molaires maxillaires sont réalisées avec une fraise ronde en carbure (H1-006, Brasseler, Charlesbourg, QC, Canada) montée sur une pièce à main programmée à 27000 tours par minute. Un arrêt en acrylique, fixé sur la fraise, permet de standardiser les perforations pulpaire sur toutes les dents (fig.1A). Les molaires controlatérales servent de contrôle. Une injection intrapéritonéale d'analgésique Temgesic<sup>®</sup> (hydrochloride de buprénorphine; Reckitt & Colman Ltd., Hull, Angleterre) est ensuite administrée aux rats pour réduire la douleur post-opératoire.

***Figure 1A:*** Photographie de la fraise ronde en carbure de tungstène (H1-006, Brasseler, Charlesbourg, Canada) utilisée pour instrumenter les molaires. Un arrêt en acrylique est placé arbitrairement à 2.8 mm de l'extrémité de la fraise. La position de l'arrêt est mesurée au moyen de la sonde parodontale.





Des images d'échantillons de molaires traitées ont été prises avec un microtomographe à rayons X assisté par ordinateur, SkyScan-1072<sup>®</sup> (SkyScan; Aartselaar, Belgique), fonctionnant à 80 kV. Ce système permet d'obtenir des images par transmission de haute définition (fig.3A), et de reconstruire, soit des coupes transversales (fig.3C), soit la micro-architecture interne tridimensionnelle de la dent, sans préparation préalable des tissus (fig.3B, D, E).

### **3.2. Préparation des tissus pour les analyses histologiques et immunocytochimiques**

Le onzième jour après la chirurgie, les rats pesant alors entre 220 et 260g sont anesthésiés avec du Métofan<sup>®</sup> (méthoxyfluorane; Janssen Pharmaceutica, North York, ON, Canada) et décapités. Le maxillaire est disséqué pour ne garder que la région de la première à la troisième molaire puis séparé en deux. Après avoir rapidement retiré les excès de tissus mous, les échantillons sont immédiatement plongés dans un béccher contenant 40 ml de fixateur à température ambiante. Cette solution est préparée le jour même du sacrifice et se compose de 4% formaldéhyde, 0.1% glutaraldéhyde tamponné à pH 7.2 avec 0.1M de tampon de sel de phosphate (PBS). Le béccher est ensuite placé dans un bac (20 x 20 cm) rempli de glace pilée soigneusement tassée autour du flacon et introduit dans un four micro-onde de laboratoire Pelco 3440<sup>®</sup> (Ted

Pella; Redding, CA, USA). La glace permet de maintenir le fixateur à une température inférieure à 37°C (Massa et Arana-Chavez, 2000) lorsqu'il est soumis aux radiations du four micro-onde. La température du fixateur est contrôlée par un thermomètre dont l'extrémité est immergée dans le bécher. Le micro-onde est programmé à une puissance de 100% pour une durée de 6 minutes. On réalise ainsi quatre cycles de six minutes chacun. Après la première fixation, l'excédent de tissus mous est retiré des surfaces alvéolaires et dentaires à l'aide d'une curette parodontale sous le microscope. Entre chaque cycle, les spécimens sont plongés dans une nouvelle solution de fixateur et le bac est de nouveau rempli de glace pilée avant d'être réintroduit dans le micro-onde. Lorsque la fixation au micro-onde est terminée, les segments maxillaires sont placés dans une solution de fixateur à 4°C toute la nuit. Le lendemain de la fixation, les spécimens sont lavés dans du PBS à 0.1M à pH 7.2.

Les segments maxillaires sont ensuite décalcifiés dans 25ml de solution de 4.13% d'acide éthylène diamine tétra-acétique (EDTA) (Warshawsky et Moore, 1967) au four micro-onde pour une durée totale de 20 heures. La procédure est semblable à celle de la fixation. Les béchers contenant les spécimens sont placés dans un grand récipient rempli de glace pilée toujours soigneusement tassée. La température maximale du micro-onde est

programmée à 37°C et la puissance à 100% pour une durée de 15 minutes. À chaque cycle, la glace est remplacée et la solution de décalcification est changée toutes les heures pendant les six premières heures puis toutes les deux heures. Lorsque la décalcification au micro-onde n'est pas terminée pendant la journée, les spécimens sont placés dans une solution de 4.13% EDTA à 4°C toute la nuit et on reprend la procédure le lendemain.

Après la décalcification des tissus, les molaires sont séparées avec une lame de rasoir. Ensuite, les premières et deuxièmes molaires sont sectionnées en deux dans le sens mésio-distal afin de passer par la cavité réalisée dans la chambre pulpaire. Les troisièmes molaires sont laissées entières car leur taille réduite permet difficilement de les couper en deux. Les spécimens sont lavés dans du PBS 0.1M à pH 7.2. Ils sont ensuite déshydratés dans une solution d'éthanol à concentrations croissantes et enrobés dans la résine LR White<sup>®</sup> (London Resin Company, Berkshire, Angleterre) à l'intérieur de capsules de gélatine fermées. Chaque segment de molaire est orienté de manière à ce que la face pulpaire soit en contact avec le fond des capsules. La résine est ensuite polymérisée à 58°C pendant 48 heures.

Chaque segment dentaire est orienté le long de l'axe longitudinal de la dent pour obtenir des coupes semi-fines de 1µm d'épaisseur de la région d'intérêt.

Les coupes sont réalisées à l'aide de couteaux de verre montés sur un ultramicrotome Reichert Jung Ultracut E<sup>®</sup> puis colorées avec du bleu de toluidine pour l'observation au microscope optique. Des coupes fines de 80 à 100 nm sont ensuite obtenues à l'aide de couteaux de diamants puis déposées sur des grilles de nickel comprenant 200 mailles et recouvertes d'un film Formvar<sup>®</sup> et de carbone. Les coupes sont ensuite traitées pour l'immunocytochimie à l'or colloïdal permettant de détecter les protéines amélaire et osseuses (revue de Bendayan, 1995).

### **3.2.1. Immunocytochimie**

L'immunocytochimie est une forme de « biochimie sur coupe » qui permet de caractériser la présence et la distribution des constituants moléculaires dans plusieurs tissus et cellules variés de différentes espèces animales, des invertébrés jusqu'aux mammifères. Parmi les différentes méthodes disponibles, l'immunomarquage à l'or colloïdal est largement utilisé en biologie cellulaire puisqu'il permet une localisation à haute résolution et une quantification du marquage de différentes protéines (revue dans Bendayan, 1995).

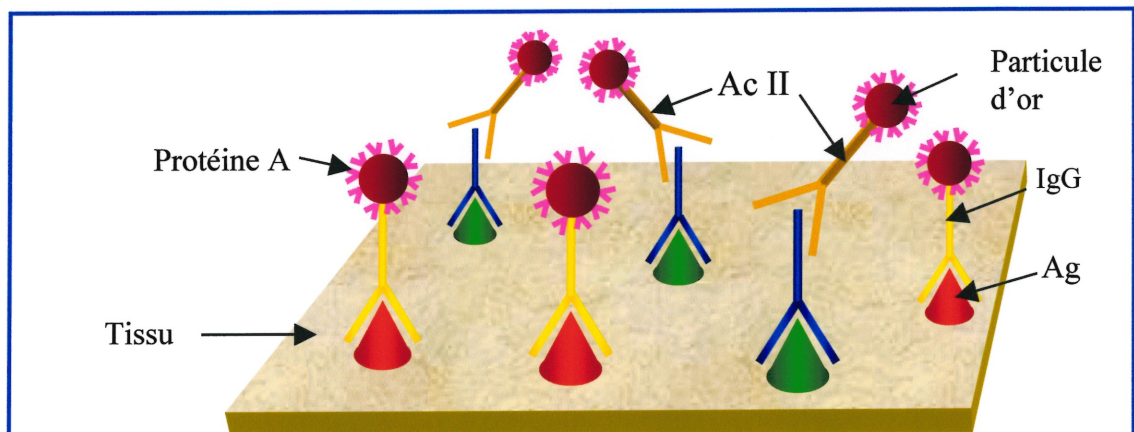
Les immunomarquages des deux principales catégories de protéines amélaire, l'amélogénine (AMEL) et l'améloblastine (AMBN) (Fincham *et al.*, 1999), ainsi que de l'ostéopontine (OPN) et la sialoprotéine osseuse (BSP) ont été

réalisés à température ambiante. Les différents anticorps polyclonaux utilisés pour l'immunocytochimie sont dirigés contre les antigènes de rats (Tableau I). Les coupes sont d'abord déposées sur une goutte d'une solution de blocage de 0.01M de PBS, pH 7.3, contenant 1% d'ovalbumine (PBS-Oval) (Sigma Chemical Co., St.Louis, MO) pendant 15 minutes. Cette solution va saturer les sites de liaison non spécifiques (revue dans Bendayan, 1995). Par la suite, les coupes sont déposées sur une goutte d'anticorps, pour une période d'une ou de trois heures. Les coupes sont ensuite lavées avec du PBS et replacées dans le PBS-Oval. Les sites de liaison antigène-anticorps sont révélés soit directement en incubant les coupes avec un complexe de protéine A-Or (revue de Bendayan, 1995) pendant 30 minutes, soit en les incubant au préalable avec un anticorps secondaire de lapin anti-IgG de poule (dilué à 1:2000 dans 0.01M PBS) (Cappel Research Products; Scarborough, ON, Canada) pendant une heure (fig.1B). Le complexe protéine A-Or est élaboré au laboratoire avec des particules d'or colloïdal de 8 à 12 nm (Frens, 1973).

Après l'immunomarquage, les coupes sont lavées avec un tampon phosphate (PBS) à pH 7.4, rincées avec de l'eau distillée et séchées à l'air. Elles sont ensuite colorées avec une solution de 4% d'acétate d'uranyle et du citrate de plomb pour l'observation au microscope électronique à transmission JEOL JEM-1200EX-II<sup>®</sup> fonctionnant à 60kV.

**Tableau I :** Les différents anticorps utilisés, l'animal hôte, la dilution et le temps d'incubation pour chacun d'entre eux.

Anticorps primaire	Abréviation	Animal hôte	Dilution	Anticorps secondaire	Temps d'incubation	Référence
Amélogénine 24-kDa	<b>AMEL-24</b>	Poule (oeuf)	1:150	oui	3 h	Nanci et al. (1996a)
Améloblastine	<b>AMBN</b>	Lapin	1:20	non	1 h	Nanci et al. (1998)
Ostéopontine	<b>OPN</b>	Poule (oeuf)	1:150	oui	3 h	Nanci et al. (1996b)
Sialoprotéine osseuse (LF-87)	<b>BSP</b>	Lapin	1:20	non	1 h	Fisher et al. (1995)



**Figure 1B :** Illustration schématique des techniques directe et indirecte d'immunomarquage à l'or colloïdal. Dans la technique directe, l'immunoglobuline spécifique (IgG), marquée avec la protéine A-or, interagit directement avec l'antigène (Ag). La particule d'or permet l'identification du site antigénique. Dans la technique indirecte, dans un premier temps, l'immunoglobuline, sous sa forme « native », interagit avec le site antigénique sur le tissu et forme un complexe antigène-anticorps. Dans un second temps, un anticorps secondaire marqué (Ac II), dirigé vers le premier, adhère à l'immunoglobuline « native » et va permettre ainsi de révéler indirectement les sites antigéniques.

# R É S U L T A T S

## 4. RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX

Le protocole suivi et décrit dans l'étude de Hamamoto *et al.* (1996) est très sommaire. Il a donc fallu s'imposer des critères rigoureux pour rendre notre procédure chirurgicale consistante et reproductible.

Le succès de la perforation de la chambre pulpaire des premières et deuxièmes molaires repose sur quatre critères cliniques : (1) La présence du saignement dû à l'exposition de la pulpe et/ou la perforation du plancher pulpaire (fig.2); (2) Le respect de la position de l'arrêt fixé à 2.8mm par rapport à l'extrémité de la fraise (fig.1A). Cette position a été déterminée après évaluation de la profondeur moyenne du plancher pulpaire sur des radiographies préliminaires; (3) La perforation doit être relativement centrée sur les dents (fig.3A-E); (4) L'inclinaison de la fraise doit être parallèle à l'axe de la dent (fig.3D).

### 4.1. Considérations relatives à la technique expérimentale

Plusieurs particularités techniques sont apparues au cours de l'expérimentation et du traitement des tissus pour la microscopie optique et l'immunocytochimie.



Tout d'abord, les considérations techniques observées au cours de la chirurgie doivent être mentionnées. Malgré les écarteurs destinés à ouvrir largement la gueule de l'animal, l'accès aux deuxièmes molaires reste difficile. L'axe de la fraise reste relativement parallèle à celui de la dent pour la perforation des premières molaires mais son inclinaison augmente pour les deuxièmes molaires, situées plus distalement et risque ainsi de fausser la profondeur de la perforation.

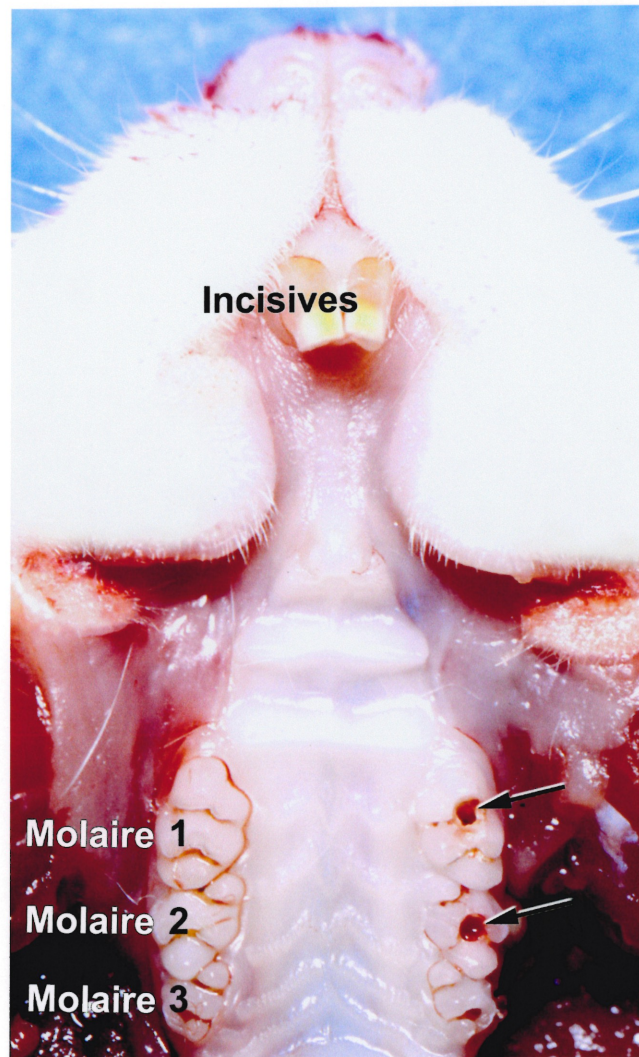
Un second point à prendre en compte est l'irrigation de la dent, au cours de la perforation pulpaire, qui se fait au moyen de quelques gouttes de sérum physiologique. L'aspiration du liquide au contact de la dent est d'une importance capitale pour éviter que le sérum ne soit inhalé et devienne ainsi fatal pour l'animal. Malgré l'aspiration rigoureuse, deux animaux sont décédés et ont donc été exclus de l'étude.

Après une période de 11 jours, un exsudat apparaît dans la région interradiculaire des molaires et fragilise les dents et l'os alvéolaire. La dissection de ces dents n'en devient que plus délicate.

L'hémisection apparaît également quelque peu difficile à réaliser sur certaines molaires contrôles dont la décalcification n'a pas été complète, et ce malgré

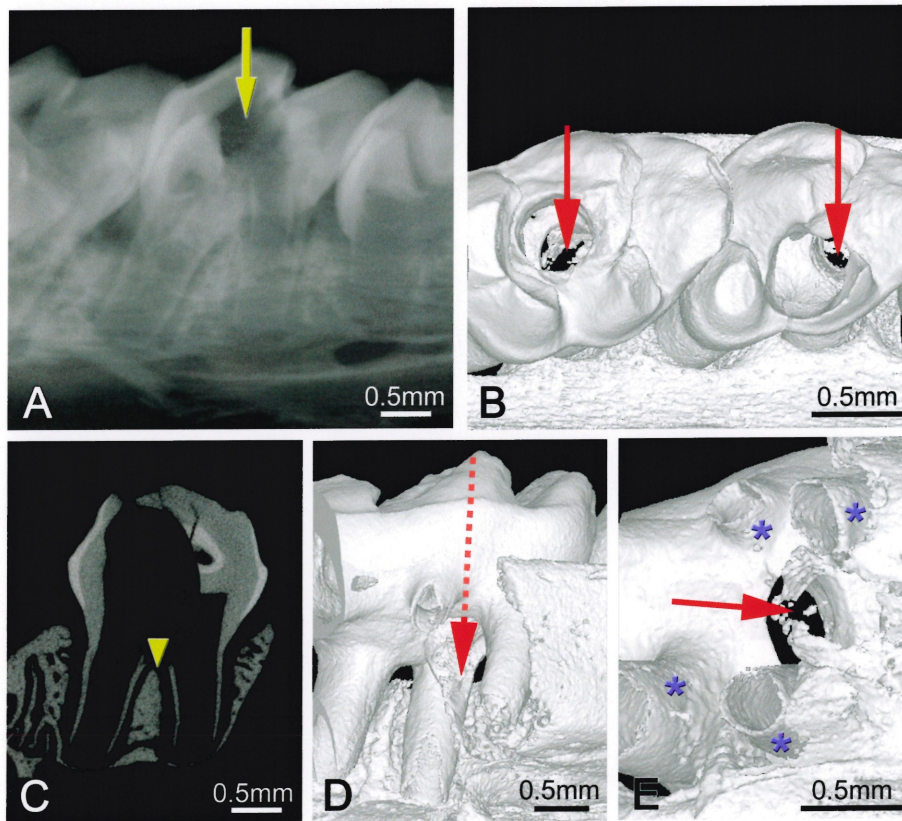
une augmentation du temps de décalcification. Cependant, les perforations réalisées sur les dents traitées ont permis une diffusion plus importante des solutions de fixation et de décalcification à travers les tissus.

## Figure 2



*Photographie occlusale illustrant les cavités pulpaires (flèches) réalisées sur la première et la deuxième molaires maxillaires d'un rat pesant 130g. Le saignement visible sur la surface coronaire des molaires est significatif de l'exposition pulpaire. Les dents controlatérales ainsi que les troisièmes molaires constituent les contrôles.*

## Figure 3



*Localisation de la perforation pulpaire sur les molaires maxillaires par microtomographie à rayons X assistée par ordinateur, SkyScan-1072<sup>®</sup> (SkyScan; Aartselaar, Belgique). (A) : Radiographie latérale d'un segment du maxillaire illustrant l'exposition de la pulpe (flèche) sur la deuxième molaire. (B, D, E) : Reconstitutions tridimensionnelles des première et/ou deuxième molaires traitées par perforation du plancher pulpaire (flèches) en vue occlusale (B), latérale (D), et apicale (E). (C) : Coupe sagittale reconstituée, passant par la cavité réalisée sur la première molaire. La lésion du plancher pulpaire (tête de flèche) est visible sur cette coupe ainsi que dans les reconstitutions tridimensionnelles en vue occlusale (B) et apicale (E) (zones noires). L'axe de l'ouverture de la chambre pulpaire est parallèle à celui de la dent (D, flèche en pointillé) et le site de la perforation est localisé entre les racines (astérix) de la molaire (E).*

## **4.2. Microscopie optique**

Nous allons procéder à la description de chaque tissu dentaire, d'une part du côté interne vers le côté externe de la racine et d'autre part, en direction apicale.

### **4.2.1. Dents contrôles**

La pulpe saine des dents contrôles contient des cellules mésenchymateuses et est bordée d'une rangée d'odontoblastes séparés de la dentine par une couche de tissu non calcifié, la prédentine, qui tapisse la surface interne (pulpaire) de la dentine (figs.4A,C;6A). On peut noter, sur les dents dont l'apex est encore ouvert, dans la région apicale, un changement de forme des odontoblastes. Les cellules se rétractent, deviennent plus espacées et se détachent de la surface de la prédentine (fig.8A). Au niveau de l'extrémité apicale, ces cellules sont même parfois au contact du ciment cellulaire (fig.8A). À ce stade de formation radiculaire avancée, la structure de la gaine épithéliale de Hertwig est moins définie et les cellules épithéliales commencent à se disperser. Elles sont alors disséminées dans le ligament parodontal et se retrouvent au contact du ciment et même parfois à l'intérieur d'invaginations de la matrice cémentaire, à l'extrémité apicale (fig.7D).

La dentine radiculaire, dans laquelle on peut distinguer de nombreux tubuli (fig.6A), est recouverte principalement dans ses deux tiers coronaires par un tissu minéralisé de faible épaisseur dépourvu de cellules, le ciment acellulaire avec des fibres extrinsèques (CAFE) (fig.4A,C). L'épaisseur du ciment augmente progressivement en direction apicale puis, brusquement, vers le tiers apical, il devient très épais et contient des inclusions cellulaires, les cémentocytes (figs.4C;7D). Il prend alors le nom de ciment cellulaire avec des fibres intrinsèques (CCFI). On retrouve à l'interface entre ce type de ciment et la dentine, des lacunes qui contiennent quelques débris cellulaires et qui sont bordées par une fine couche de matrice plus dense. Plus on descend vers l'apex et plus on distingue des cellules épithéliales emprisonnées à l'intérieur de ces lacunes (fig.4C).

À la périphérie de la racine, dans le ligament parodontal, des îlots de cellules épithéliales sont présents, les restes épithéliaux de Malassez, dont le nombre et la distribution varient en fonction de la dent et de l'orientation de la coupe. Cependant, ces îlots cellulaires apparaissent plus nombreux dans la région interradiculaire que dans la région apicale (fig.4A).

#### 4.2.2. Dents traitées

L'axe de la perforation de la chambre pulpaire n'est pas toujours perpendiculaire à l'axe de la dent, surtout pour les deuxièmes molaires. Dans ce cas, la fraise peut traverser une partie de la couronne des molaires et une invagination gingivale prend place dans la cavité pulpaire.

Sur toutes les dents traitées, un large tissu inflammatoire emplit la cavité pulpaire dû à la présence de nombreux corps étrangers dont les débris alimentaires, les copeaux de la litière, les poils de l'animal et les copeaux des tissus minéralisés traversés lors de la perforation pulpaire. La prolifération de multiples colonies de micro-organismes, tels les cocci et les bâtonnets (figs.4B;5A), suscite, dans certains cas, une réponse inflammatoire aiguë par de nombreux polymorphonucléaires neutrophiles au sein de la cavité pulpaire. Des bactéries logent parfois même à l'intérieur des tubuli dentinaires. On observe l'apparition d'un tissu nécrotique (figs.4B;5A) ainsi qu'un tissu conjonctif réactionnel très dense à proximité du site de l'exposition pulpaire (fig.5A). Fait particulièrement intéressant, l'étendue de ce tissu fibreux est limitée à la portion cervicale de la dent, même après une période de 11 jours, et semblerait même « freiner » la progression de l'infiltration bactérienne. De plus, au contact et à l'intérieur de celui-ci, un tissu minéralisé réticulé apparaît

au niveau cervical, près des colonies bactériennes (figs.5A;6C-D). Cette matrice de dentine réparatrice, présente sur toutes les dents traitées, est irrégulière et atubulaire et tapisse les parois radiculaires internes en suivant un gradient croissant en direction apicale (figs.4D;6E;7B).

Les odontoblastes ont disparu de la périphérie pulpaire de toutes les dents traitées (figs.4B,D;5A,B;6B-E;7A-C,E,F). La couche de pré-dentine est présente de façon inconstante au niveau coronaire, mais elle n'est généralement plus visible dans la région radiculaire et semble, dans certains cas, être remplacée par un tissu minéralisé atubulaire situé entre la dentine physiologique et la dentine réparatrice proprement dite (fig.6B-E). Cette zone intermédiaire semble avoir les mêmes dimensions que la pré-dentine. Des cellules mononucléées avec des caractéristiques fibroblastiques sont au contact de ce tissu au niveau cervical puis elles se retrouvent emprisonnées dans la dentine réactionnelle au fur et à mesure que celle-ci s'épaissit (fig.6B,E). Au niveau apical, la dentine réactionnelle présente ainsi une structure d'ostéodentine (figs.4D;6E;7B).

La surface radiculaire est occasionnellement investie de lacunes de résorption externe infiltrées par des cellules mononucléaires possédant des



caractéristiques fibroblastiques. À ce stade, aucun siège de réparation n'est visible (fig.4D).

Les matrices cémentaires acellulaire et cellulaire sont identiques à celles dents contrôles (comparer figs.4A,C;7D avec figs.4B,D;5A-C;7A,B,E). Au niveau apical, des cellules épithéliales sont également emprisonnées dans des lacunes, particulièrement au niveau de la jonction dentino-cémentaire (figs.5C;7E).

La localisation et la morphologie des restes épithéliaux de Malassez restent identiques à celles des dents contrôles (comparer agrandissements des figs.4A et 4B).

Enfin, la région apicale périradiculaire est indemne de lésions sur toutes les dents dont la pulpe a été exposée (figs.4D;7A-C,E,F) mais des lésions tissulaires sont fréquemment observées au niveau interradiculaire (fig.4B).

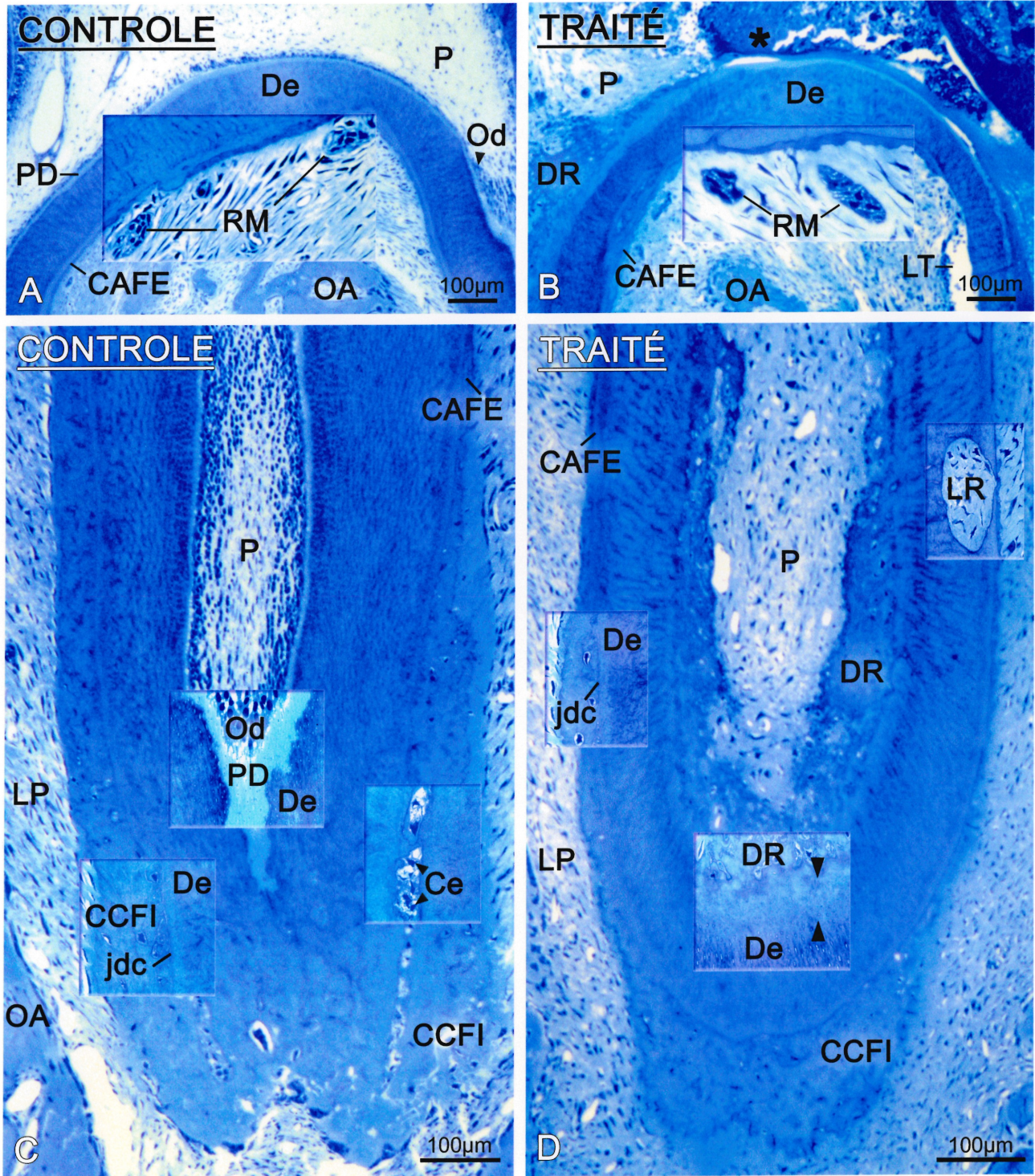
**Figure 4 :** Photographies de microscopie optique illustrant la zone interradiculaire et apicale des dents contrôles (**A, C**) et des dents traitées par exposition pulpaire (**B, D**).

(**A, C**) : La pulpe (*P*) de la dent saine est bordée par des odontoblastes (*Od*) apposés à une couche de prédentine (*PD*), tissu non minéralisé qui apparaît moins métachromatique que la dentine (*De*). La partie cervicale de la dentine radiculaire est recouverte par une fine couche de ciment acellulaire avec des fibres extrinsèques (*CAFE*) dans lequel viennent s'ancrer les fibres du ligament parodontal (*LP*) qui s'attachent également sur l'os alvéolaire (*OA*). Vers le tiers apical (**C**) le ciment s'épaissit brusquement et contient des inclusions cellulaires, il s'agit du ciment cellulaire avec des fibres intrinsèques (*CCFI*). Au niveau apical, des cellules épithéliales (*Ce*) sont emprisonnées dans des lacunes à la jonction entre le *CCFI* et la dentine (*jdc*). Les agrandissements (dans **A, B**) illustrent des îlots de cellules épithéliales situés dans le ligament parodontal, les restes épithéliaux de Malassez (*RM*).

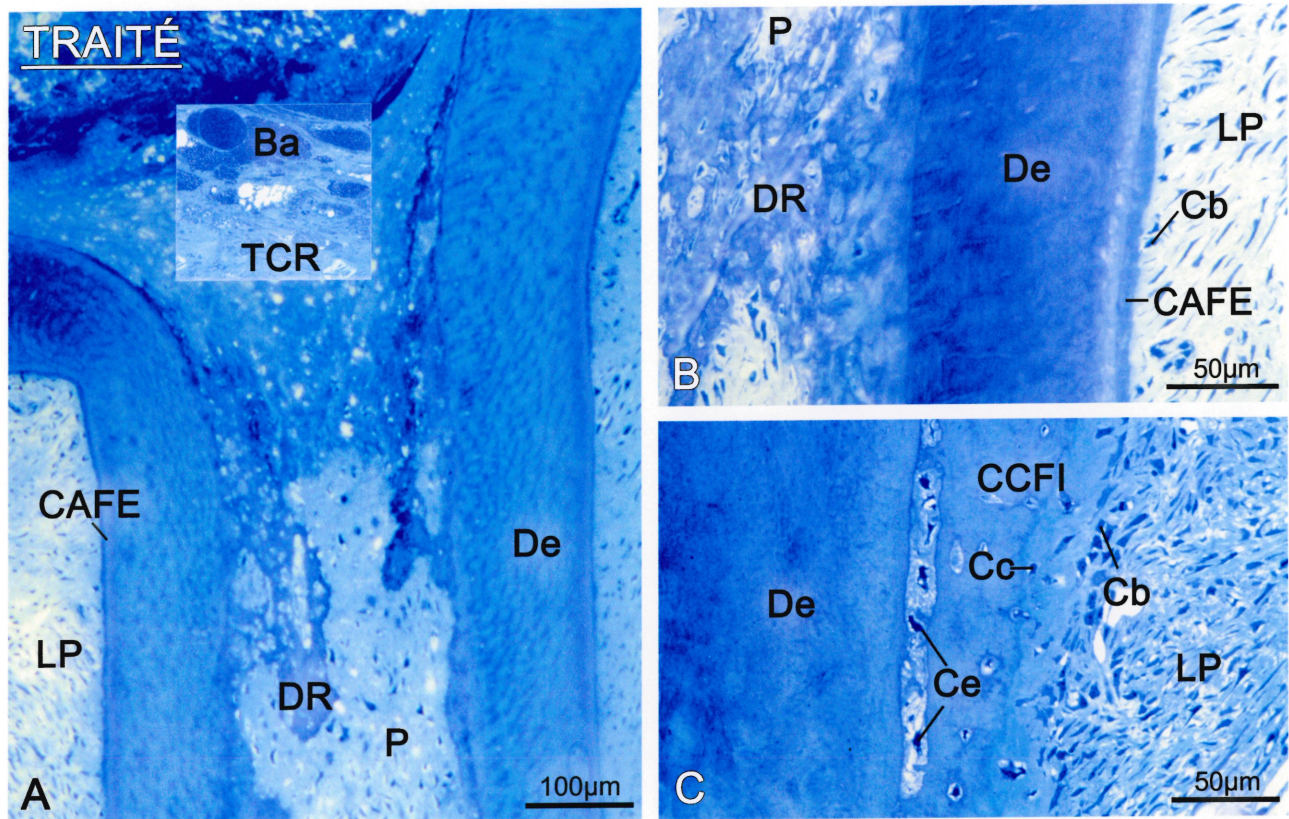
(**B**) La pulpe des dents traitées montre un infiltrat inflammatoire ainsi qu'un tissu nécrotique (astéris). En direction apicale, se forme un tissu minéralisé irrégulier situé au contact de la dentine, la dentine réparatrice (*DR*). On note la disparition des odontoblastes, la désorganisation et même l'absence de la prédentine. Des lésions tissulaires (*LT*) sont occasionnellement observées sur la surface radiculaire externe. La structure des restes épithéliaux de Malassez est semblable à celle observée dans les groupes contrôles.

(**D**) : La surface radiculaire externe de la dent traitée montre occasionnellement des lacunes de résorption (*LR*) contenant des cellules avec des caractéristiques fibroblastiques. La dentine radiculaire longe les parois pulpaires de la dentine et s'épaissit dans la région apicale. On ne distingue plus de couche de prédentine mais la région dentinaire au contact de la dentine réparatrice (têtes de flèche) est constituée d'un tissu plus métachromatique que la prédentine.

Figure 4

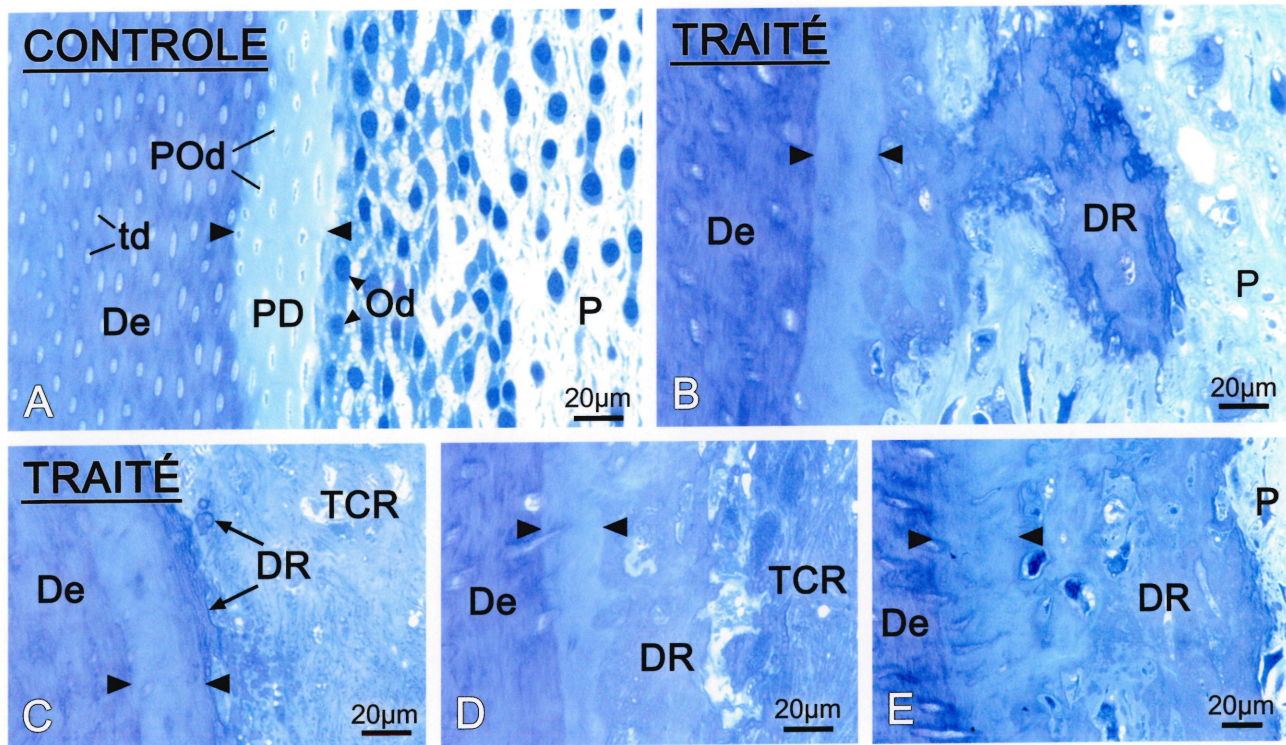


## Figure 5



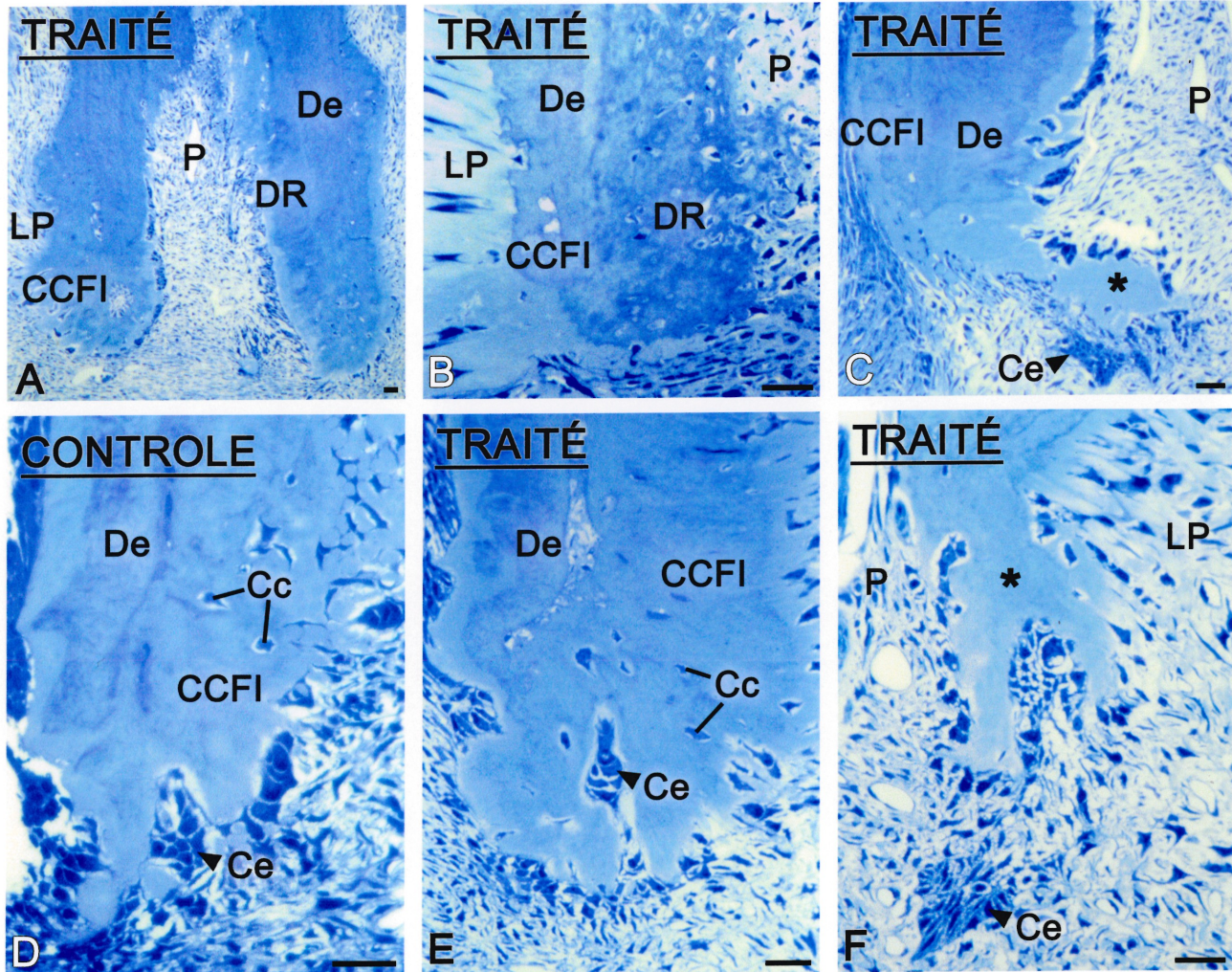
Photographies de microscopie optique illustrant (A) l'altération tissulaire suite à l'exposition pulpaire. La pulpe contient de nombreux débris et des bactéries (Ba) au contact desquels se forme un tissu conjonctif réactionnel (TCR) (agrandissement dans A). On peut noter l'absence d'un infiltrat inflammatoire significatif. Une fine couche de dentine réparatrice (DR) est notée dans la région cervicale qui s'épaissit progressivement en direction apicale, au fur et à mesure qu'elle s'éloigne de la région inflammatoire. (B, C) : Agrandissement des deux principaux types de ciment. (B) : Environ les deux-tiers cervicaux de la surface radiculaire externe de la dentine (D) sont recouverts par du ciment acellulaire avec des fibres extrinsèques (CAFE) de faible épaisseur dans lequel s'ancrent les fibres du ligament parodontal (LP). (C) : Le ciment cellulaire avec des fibres intrinsèques (CCFI) situé principalement dans le tiers apical est produit par les cimentoblastes (Cb) qui longent la surface externe du ciment et se retrouvent ensuite emprisonnés dans la matrice cimentaire sous la forme de cimentocytes (Cc). La jonction dentino-cémentaire est fréquemment occupée par de nombreuses cellules épithéliales (Ce) emprisonnées dans des lacunes.

## Figure 6



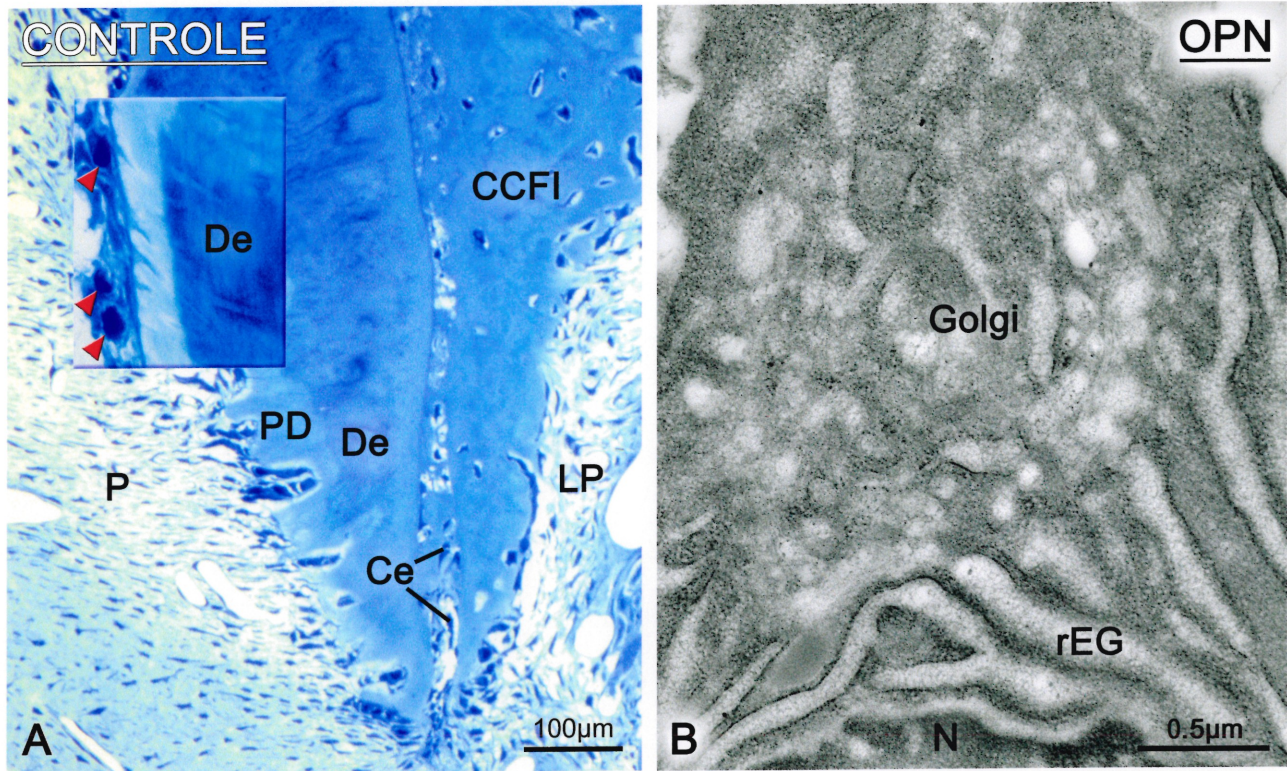
Photographies de microscopie optique comparant la surface pulpaire de la dentine sur une dent contrôle (A) et sur des dents traitées (B-E). La portion externe de la pulpe (P) des dents contrôles (A) est bordée d'odontoblastes (Od) qui sécrètent les protéines d'une matrice non minéralisée, la prédentine (PD), qui apparaît moins métachromatique que la dentine (De). Les prolongements odontoblastiques (POd) traversent à la fois la prédentine et la dentine. (B) : La dentine de la dent traitée est séparée de la dentine réparatrice (DR) par une zone minéralisée acellulaire (entre les têtes de flèches) dont la gamme d'épaisseur semble correspondre à celle de la prédentine. L'aspect de la dentine réparatrice en direction apicale est illustrée sur les photographies suivantes (C-E). (C) : La pulpe est envahie par un tissu conjonctif réactionnel (TCR), à proximité duquel on aperçoit la dentine réparatrice, qui prend la forme de globules ou de masses plus étendues (flèches). Plus on descend dans la région apicale et plus l'épaisseur de la dentine réparatrice augmente (D) avec des inclusions cellulaires plus nombreuses (E). td, tubuli dentinaires.

## Figure 7



Photographies de microscopie optique illustrant la région apicale de molaires traitées (A-C, E, F) et contrôle (D) dont l'apex est largement ouvert. Aucune lésion périapicale n'est détectée sur les dents dont la pulpe (P) a été exposée (A-C, E, F). De nombreuses cellules épithéliales (Ce) sont en contact ou à proximité de l'extrémité apicale des dents traitées et contrôle (A, C-F) alors que la matrice de cément cellulaire avec des fibres intrinsèques (CCFI) contient des inclusions de cémentocytes (Cc). Les dents traitées ne présentent généralement aucune modification dans cette région par rapport aux dents contrôles (comparer D et E). Parfois, la dentine réparatrice (DR) s'accumule au niveau apical et apparaît directement au contact du CCFI (B). Exceptionnellement, une excroissance de ciment (astérisque), moins métachromatique que le CCFI et la dentine (De), apparaît sur les dents traitées, à proximité d'un groupe de cellules épithéliales (C, F). LP, ligament parodontal. Échelle = 0.5  $\mu$ m.

## Figure 8



*Photographie de microscopie optique (A) et de microscopie électronique d'une coupe incubée avec un anticorps contre l'ostéopontine (OPN) (B), illustrant les odontoblastes (têtes de flèches), situés dans la région apicale, sur des dents contrôles dont l'apex est ouvert. Ces cellules sont arrondies et espacées, et se détachent de la surface de la prédentine (PD) (A). Elles possèdent un large réticulum endoplasmique granuleux (rEG) et un appareil de Golgi très développé, sur lequel peu de particules d'or d'OPN sont détectées (B). CCFI, ciment cellulaire avec des fibres intrinsèques; Ce, cellule épithéliale; De, dentine; LP, ligament parodontal; P, pulpe; N, noyau.*

### **4.3. Microscopie électronique**

#### **4.3.1. Fixation et décalcification par micro-onde**

La préparation des tissus pour l'immunocytochimie résulte généralement d'un compromis entre la qualité de la préservation structurale et le degré de rétention de l'antigène dirigé contre l'anticorps de la protéine testée. Généralement, on utilise deux principales techniques de fixation chimique : l'immersion et la perfusion. Ces techniques présentent à la fois des avantages et des inconvénients. L'immersion est la technique la plus utilisée mais son application pour l'étude ultrastructurale est limitée. En effet, la préservation est affectée par la vitesse de pénétration du fixateur à l'intérieur des tissus (revue de Hayat, 2000), d'autant que pour les tissus calcifiés, la présence de minéral constitue une barrière supplémentaire à la diffusion du fixateur. La perfusion est donc indiquée pour ces tissus (Nanci et Warshawsky, 1984), elle consiste à diffuser l'agent fixateur à travers tous les tissus du corps via les capillaires et nécessite une grande quantité de solution. De plus, cette technique est plus complexe et son efficacité dépend du degré d'expérimentation de l'utilisateur. Nous avons donc opté pour une technique de fixation par irradiations au micro-onde qui a déjà fait ses preuves au sein du laboratoire. L'utilisation du micro-onde est reconnue pour la préservation



ultrastructurale de germes de molaires de rat (Massa et Arana-Chavez, 2000) et pour réduire le temps de décalcification à l'EDTA (Madden et Henson, 1997; Faltin *et al.*, 2001). En effet, une exposition prolongée aux solutions de décalcification peut provoquer des dommages aux structures cellulaires. De plus, l'efficacité de cette technique a été prouvée en immunocytochimie puisqu'elle permet d'améliorer la rétention des antigènes sur des tissus minéralisés (Arana-Chavez et Nanci, 2001).

L'application de cette technique d'irradiation au micro-onde, dans notre protocole expérimental, a confirmé sa validité. Tous les tissus dentaires et périodontaires montrent effectivement une bonne préservation ultrastructurale et les détails des organites cellulaires sont généralement clairement visibles. Cependant, les résultats sont moins satisfaisants du point de vue de la décalcification puisque, au sein des molaires contrôles, certaines plages de tissus dentinaires et cémentaires encore calcifiées sont présentes.

### 4.3.2. Dents contrôles

De la même façon que pour la microscopie optique, nous allons passer en revue la description ultrastructurale des différents tissus minéralisés radiculaires en rapport avec l'immunoréactivité de ces tissus pour les protéines non collagéniques : l'ostéopontine (OPN), la sialoprotéine osseuse (BSP), et les protéines amélares : l'amélogénine (AMEL) et l'améloblastine (AMBN). Notons qu'aucune altération tissulaire n'est notée concernant la structure et la composition du ciment et de la jonction dentino-cémentaire, c'est pourquoi les illustrations des figures 10 à 13 proviennent à la fois des dents contrôles et traitées sans aucune spécification.

#### 4.3.2.1. Le ciment

Le CAFE est situé approximativement dans les deux-tiers cervicaux de la surface radiculaire externe. Il contient non seulement des composants intrinsèques du ciment mais également les extrémités distales des fibres du ligament parodontal (fibres de Sharpey) (fig.9E). Tout cet ensemble constitue le CAFE. Il est composé d'une accumulation de matériel organique finement réticulé (fig.9E,F), ou parfois plus granuleux, dispersé à travers les fibres de collagène. La matrice interfibrillaire réagit fortement avec l'anticorps anti-OPN (fig.9F) et l'anti-BSP alors qu'elle ne présente aucun marquage avec l'anti-AMBN (fig.9E) et l'anti-AMEL.

La matrice cémentaire située principalement dans le tiers apical, le CCFI, comporte de nombreuses inclusions cellulaires de cémentocytes (figs.9B-D;10). Ces cellules présentent des morphologies variées : certaines sont plutôt allongées, d'autres présentent une forme plus cuboïdale avec peu d'organites cellulaires ou encore une forme stellaire avec un long prolongement cellulaire (fig.10). De la même façon que pour l'os, le CCFI présente parfois des zones d'accumulation de matériel organique réticulé isolés (figs.10-13) dans lequel on trouve une concentration d'ostéopontine (OPN) (figs.10;12C) et de sialoprotéine osseuse (BSP). Les cémentocytes ne présentent par contre aucune immunoréactivité intracellulaire pour les protéines non collagéniques (PNCs). L'apparence des fibres de Sharpey, qui s'insèrent dans le ciment, varie considérablement et va influencer l'accumulation du matériel organique non collagénique autour et entre les fibres de collagène. En général, la matrice extracellulaire de la surface la plus externe du CCFI est plus immunoréactive pour les PNCs que les régions les plus internes. De plus, le matériel afibrillaire du CCFI réagit moins que le CAFE avec les anticorps dirigés contre l'OPN (fig.9B) et la BSP (fig.9C) et pas du tout avec les protéines amélaire (AMBN, AMEL) (figs.9D;10).

#### 4.3.2.2. Jonction dentino-cémentaire

La jonction dentino-cémentaire est caractérisée par une pauvreté en fibres de collagène. Quand elle est présente, la ligne électron-dense, au niveau de cette jonction, ne montre pas d'accumulation préférentielle pour la sialoprotéine osseuse (BSP) ou l'ostéopontine (OPN), bien que ces protéines se concentrent à proximité de cette ligne (fig.9F). Dans la région apicale, des masses de cellules dérivant de la gaine épithéliale de Hertwig sont emprisonnées dans les lacunes situées entre la dentine et le ciment (figs.11-13). La périphérie de ces lacunes est composée d'une matrice granulaire faible en collagène mais dont le matériel non collagénique réagit fortement avec l'améloblastine (AMBN) (figs.11A,B;12A;13B). Les anticorps dirigés contre l'OPN et la BSP présentent un patron diffus au sein de cette zone bordante et ne semblent pas s'y accumuler (fig.12B,C). En fait, le marquage semble plutôt externe à cette zone. Aucune particule d'or révélant l'amélogénine n'est néanmoins détectée dans cette région (figs.11C;13A). De plus, cette zone présente des aspects très variables. Elle peut être associée ou non à des lignes électron-denses. Parfois du matériel fibro-réticulé est présent à l'intérieur de la lacune avec une immunoréactivité très faible pour l'AMBN et inexistante pour l'OPN, la BSP et l'AMEL.

#### 4.3.2.3. La dentine

La matrice extracellulaire de la dentine contient, en plus du collagène, diverses protéines non collagéniques. La dentine circumpulpaire et la pré-dentine sont traversées par les prolongements odontoblastiques qui logent dans des tubuli dentinaires au sein de la dentine (fig.9A). Quelques particules d'or révélant l'amélogénine (AMEL) et l'améloblastine (AMBN) sont éparpillées au sein de la matrice dentinaire et représentent essentiellement un bruit de fond. Même si l'immunoréactivité pour la sialoprotéine osseuse (BSP) et l'ostéopontine (OPN) est faible, on retrouve un marquage diffus à travers la matrice afibrillaire. Les odontoblastes présentent un marquage important pour l'OPN dans la région cervicale, qui décroît progressivement en direction apicale (figs.18A;8B) alors qu'aucun marquage n'a été détecté pour la BSP.

#### 4.3.3. Dents traitées

Conformément à l'observation en microscopie optique, les matrices cémentaires CAFE et CCFI ne présentent aucune altération ultrastructurale majeure comparée aux dents contrôles décrites précédemment. Par contre, au sein de la cavité pulpaire, la formation d'une matrice minéralisée de dentine réparatrice a retenu notre attention, suite à l'infiltration bactérienne et l'inflammation.

#### 4.3.3.1. Les bactéries

Dans certains cas, les bactéries de type cocci et les bâtonnets présentent un marquage notable pour aussi bien l'OPN, la BSP que l'AMEL et l'AMBN. Ces résultats concordent avec l'étude de Nanci *et al.* (1999) qui avaient cependant noté un patron de marquage varié. Ces données ne sont pas surprenantes lorsque l'on étudie l'origine de la protéine A de plus près. En effet, cette protéine est utilisée pour ses propriétés d'adhésion aux immunoglobulines par une réaction pseudo-immune (fig.1B), et provient des staphylocoques (revue de Bendayan, 1995). De plus, il a été montré que, suite à une inflammation pulpaire, la pulpe renferme des quantités importantes d'immunoglobulines, et en particulier les IgG (revue de Bergenholtz, 1981) sur lesquelles la protéine A pourrait se fixer. La spécificité de l'immunoréactivité des bactéries pour les différentes protéines non collagéniques reste cependant à corroborer.

#### 4.3.3.2. La dentine

La dentine « saine » se distingue des tissus réactionnels par son très faible marquage pour l'OPN et la BSP. Cependant, à la jonction entre la zone intermédiaire (décrite ci-dessous) et la dentine, les tubuli dentinaires traversant la dentine sont caractérisés par une accumulation d'OPN et de BSP à l'intérieur de ceux-ci.

#### 4.3.3.3. La zone intermédiaire

Cette région est très riche en collagène. Le matériel afibrillaire réagit fortement à l'OPN et à la BSP mais aucune immunoréactivité pour les protéines amélaire n'a cependant été détectée.

#### 4.3.3.4. La dentine réparatrice

Au niveau cervical, la dentine réparatrice est localisée à proximité des bactéries (fig.15A). Plus on descend dans la région apicale, moins il y a de bactéries, et plus on observe des plages de dentine réparatrice associées à de larges cellules dégénérantes ayant perdu leurs organites intracytoplasmiques (fig.17). La dentine réparatrice peut prendre différents aspects structuraux (figs.14-17;18D). Généralement, il s'agit de la juxtaposition d'un tissu granulaire pauvre en collagène et d'un tissu plus riche en fibres de collagène mais dont le matériel afibrillaire est peu marqué. Le tissu granulaire est riche en matériel non collagénique ayant une immunoréactivité importante pour l'OPN (figs.14-15;16A,C;17;18D), plus modérée pour la BSP (fig.16B) et inexistante pour l'AMBN et l'AMEL (fig.16D). Les proportions de fibres de collagène et de matériel organique peuvent varier et résulter en un tissu plus ou moins granulaire (fig.17). Généralement, ce tissu peut se présenter soit sous forme de plages étendues

(figs.14B,C;17) soit sous forme de globules, avec des tailles variables (figs.14A;15;16;18D). Les masses globulaires larges sont généralement entourées par une ou, plusieurs lignes électron-denses concentriques, qui marquent de façon inconstante pour l'OPN et la BSP (figs.15;16A-C). Ce tissu granulaire calcifié est au contact d'un tissu plus riche en fibres de collagène, identifiable par des zones électron-claires sans structure définissable, mais dont l'immunoréactivité du matériel afibrillaire pour la BSP et l'OPN est plus faible ou absente (figs.14;15;16A-C;17) alors qu'elle n'est pas détectable pour l'AMBN et l'AMEL (fig.16D). Dans certaines régions, des faisceaux de fibres de collagène clairement visibles semblent entourer des foyers de minéralisation riches en BSP et OPN.

Les cellules associées à la production de la dentine réparatrice sont des cellules mononucléées dont le corps cellulaire est de type fibroblastique (fig.18B-D). Les organites cytoplasmiques sont en situation para-nucléaire. L'appareil de Golgi et le réticulum endoplasmique granuleux sont très développés (fig.18B). Une accumulation d'OPN s'observe sur l'appareil de Golgi (fig.18B) ainsi que dans les granules de sécrétion (fig. 18C,D). Dans certaines de ces cellules, la membrane cellulaire est soit directement en contact avec des fibres de collagène (fig.18C), soit avec du matériel granulaire pauvre en collagène (fig. 18D).



4.3.3.5. Tableaux récapitulatifs de l'immunoréactivité des dents contrôles et traitées

**Tableau II :** Distribution quantitative schématique des différents anticorps utilisés au sein des tissus calcifiés radiculaires des dents contrôles.

CAFE, ciment acellulaire avec des fibres extrinsèques; CCFI, ciment cellulaire avec des fibres intrinsèques.

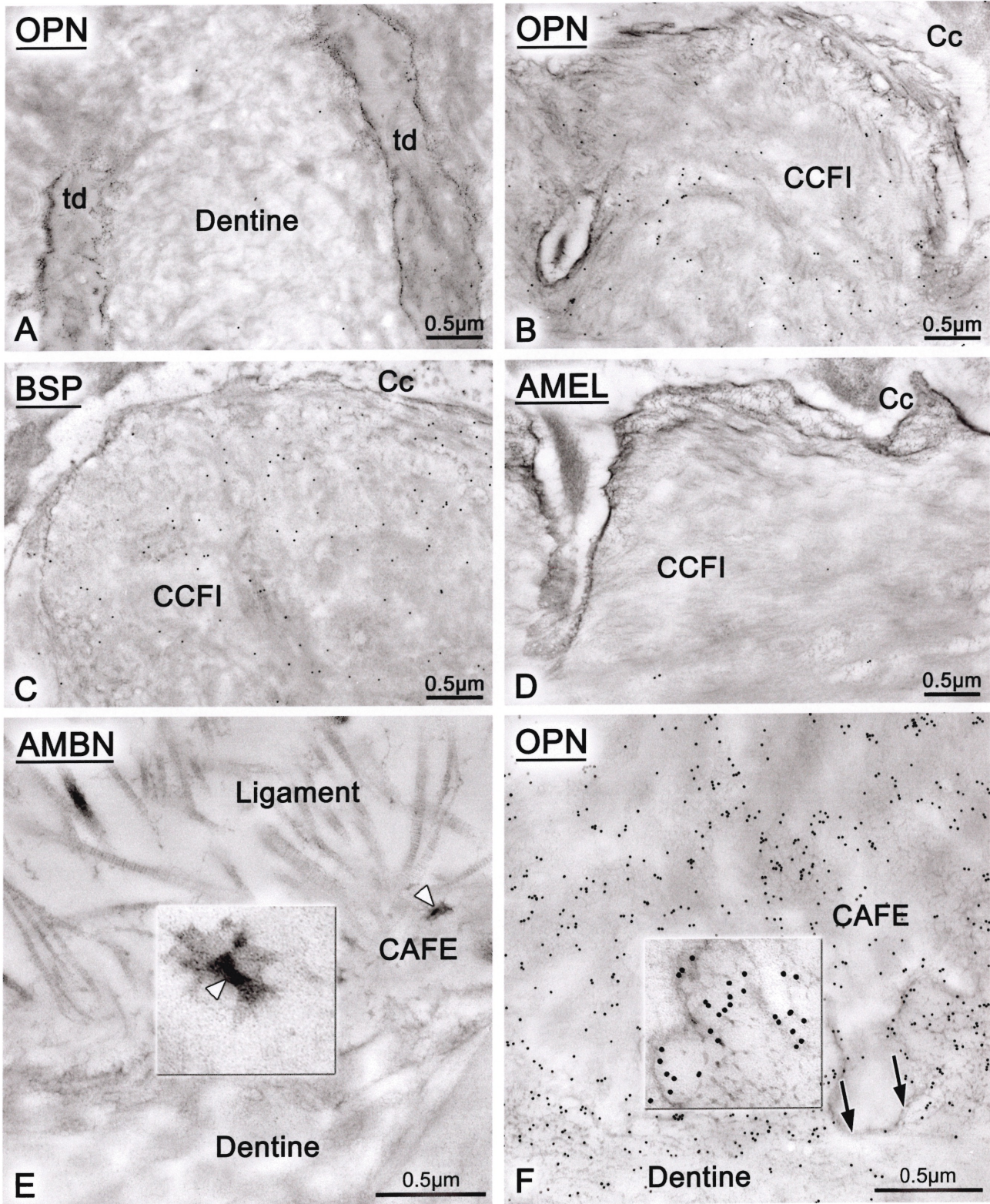
	CAFE	CCFI		Dentine	Odontoblastes	
		CCFI proprement dit	Bord de la lacune			
Améloblastine (AMBN)	-	-	3+	-	-	
Amélogénine (AMEL)	-	-	-	-	-	
Ostéopontine (OPN)	3+	2+	3+	+	+/-	+ 2+
Sialoprotéine osseuse (BSP)	3+	2+	3+	+	+/-	-

**Tableau III :** Distribution quantitative schématique des différents anticorps utilisés au sein des tissus calcifiés radiculaires des dents traitées par exposition pulpaire. DR, dentine réparatrice.

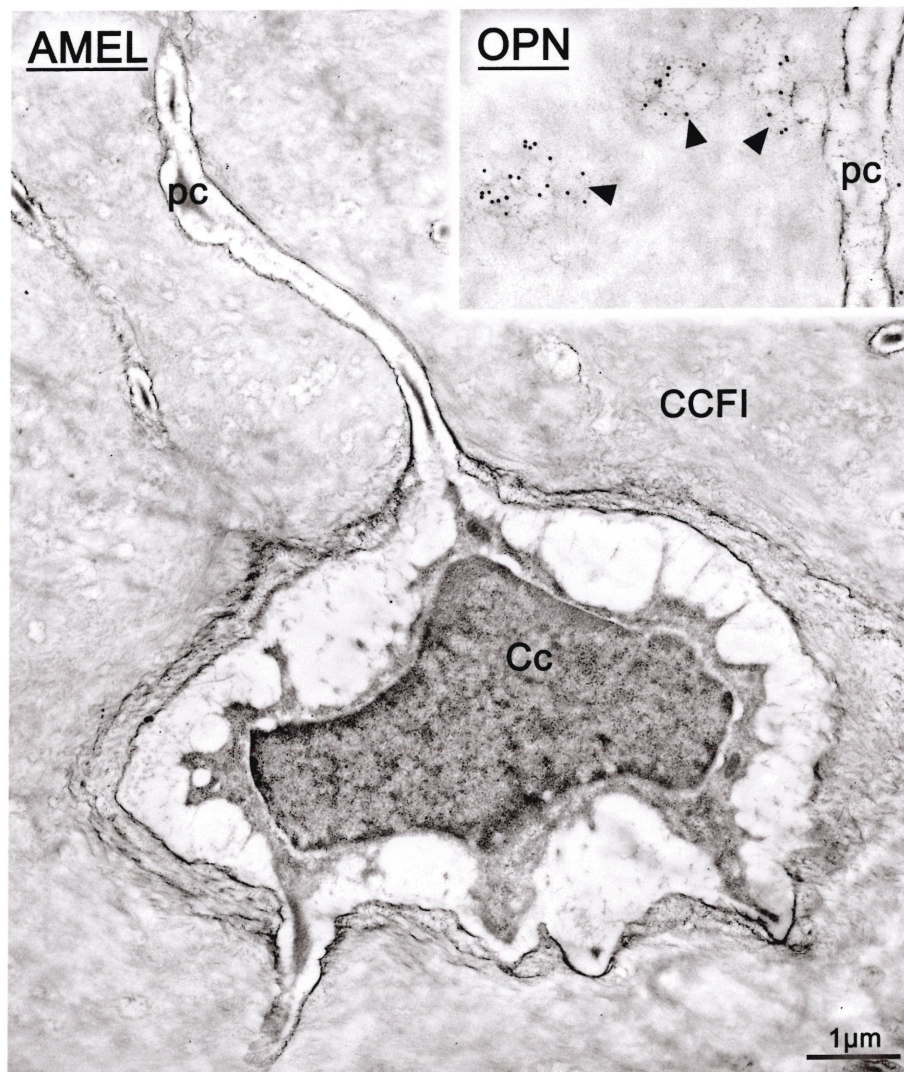
	CAFE	CCFI		Dentine	Tissu intermédiaire	DR	Cellules associées à la DR
		CCFI Proprement dit	Bord de la lacune				
AMBN	-	-	3+	-	-	-	-
AMEL	-	-	-	-	-	-	-
OPN	3+	2+	3+	+	+/-	3+ 4+	4+ 3+
BSP	3+	2+	3+	+	+/-	3+	3+ -

**Figure 9 :** Photographie de microscopie électronique à transmission illustrant des préparations immunocytochimiques avec des anticorps contre l'ostéopontine (OPN) (**A**, **B**, **F**), la sialoprotéine osseuse (BSP) (**C**), l'amélogénine (AMEL) (**D**) et l'améloblastine (AMBN) (**E**) au sein des tissus minéralisés des dents contrôles. (**A**) : La matrice dentinaire est traversée par des tubuli dentinaires (td) dans lesquels logent les prolongements des odontoblastes. (**B-D**) : Le ciment cellulaire avec des fibres intrinsèques (CCFI) contient des cémentocytes (Cc) et des fibres de collagène (zones électron-claires) associées à du matériel non collagénique (zones électron-denses) (**E**) : Le ciment acellulaire avec des fibres extrinsèques (CAFE) constitue un point d'ancrage des fibres de collagène du ligament parodontal. On peut noter des foyers initiaux de minéralisation (têtes de flèches) du CAFE en formation peu ou pas marqués avec l'AMBN (**E**). Peu de particules d'or d'OPN sont présentes dans la dentine (**A**) alors que le matériel non collagénique des deux types de ciment sont riches en OPN (**B**, **F**) et BSP (**C**). L'interface électron-dense entre le CAFE et la dentine (flèches) contient des particules d'or éparses (**F**). Le CCFI (**D**), le CAFE et la dentine (**E**) ne montrent qu'un très faible marquage pour l'AMEL et pour l'AMBN.

**Figure 9**



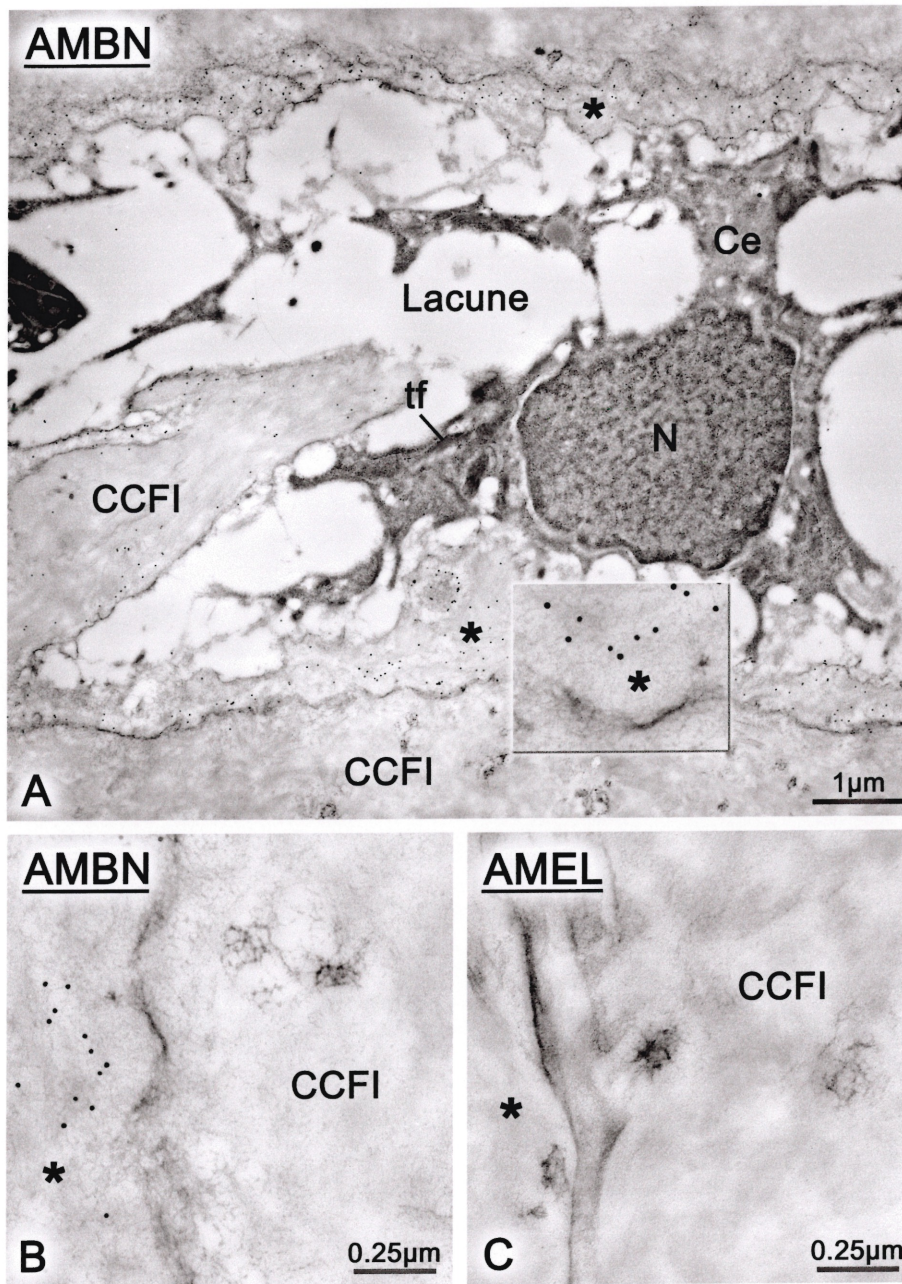
## Figure 10



*Illustration en microscopie électronique d'un cémentocyte (Cc) emprisonné dans la matrice du cément cellulaire avec des fibres intrinsèques (CCFI). Les cémentocytes sont des cellules polymorphiques logeant dans des lacunes. Une forme pseudo-stellaire est illustrée ici avec des prolongements cellulaires (pc). La lacune est délimitée par une ligne électron-dense sur laquelle peu ou pas de particules d'or d'OPN sont détectées. Des accumulations de matériel organique réticulaire afibrillaire (agrandissement) sont disséminées à travers le CCFI et montrent une immunoréactivité importante pour l'OPN (têtes de flèches) alors que très peu de particules d'or d'AMEL sont présentes dans cette matrice cémentaire.*

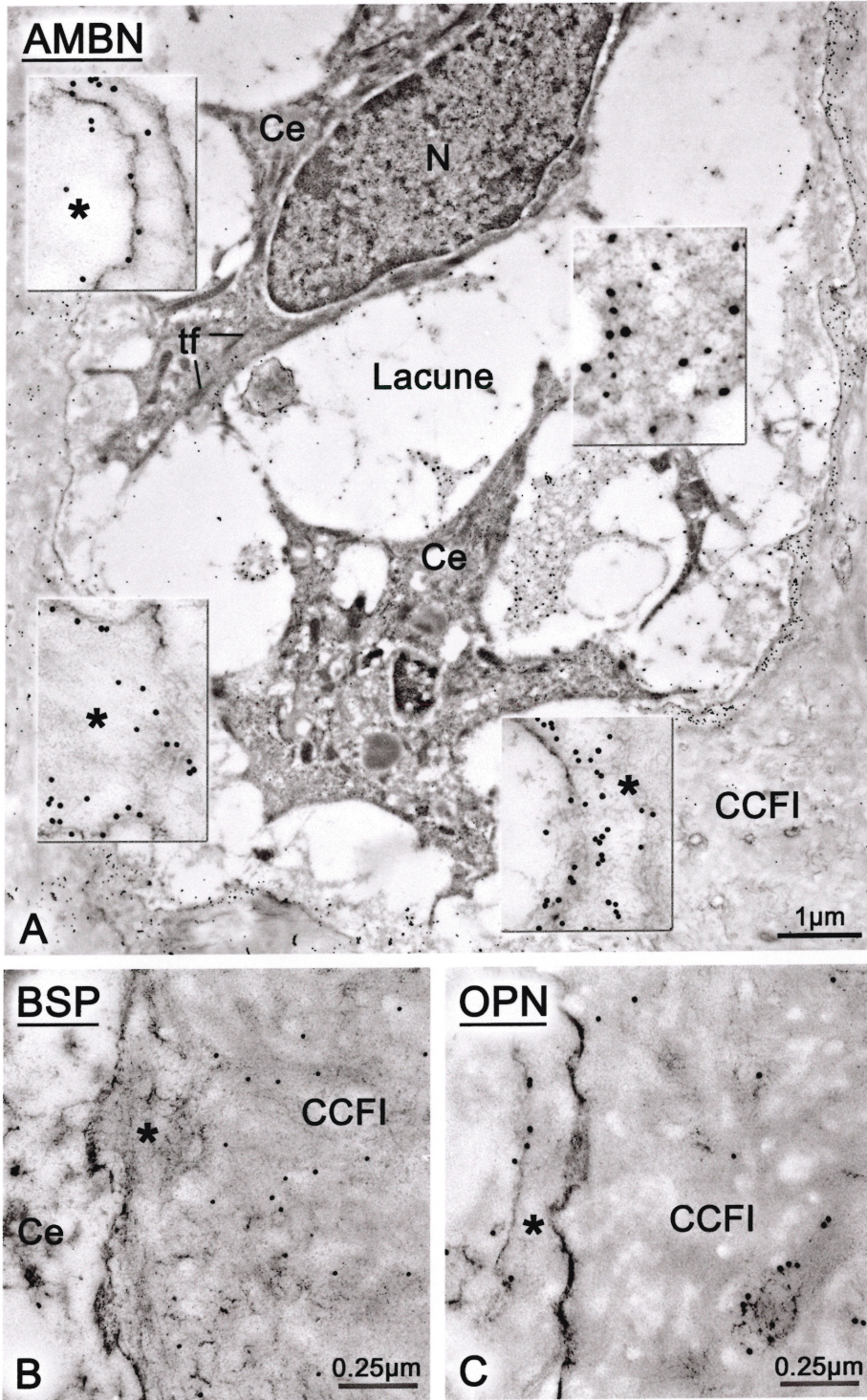
**Figure 11** : Préparations immunocytochimiques avec des anticorps contre l'améloblastine (AMBN) (**A, C**) et l'amélogénine (AMEL) (**B**) illustrant la jonction entre une lacune, dans laquelle loge une cellule épithéliale (Ce), en contact avec le ciment cellulaire avec des fibres intrinsèques (CCFI) et à proximité de la dentine. (**A**) : La présence de tonofilaments (tf) à l'intérieur du cytoplasme de la cellule confirme son origine épithéliale. Cette cellule loge dans une lacune dont la périphérie consiste en une couche de matrice (astérix) riche en AMBN (**A, C**) mais aucune particule d'or d'AMEL ne s'y retrouve (**B**). Les lignes électron-denses associées à cette zone montrent un marquage très faible avec l'AMBN (**A, C**). Le CCFI proprement dit contient peu ou pas de particules d'or d'AMBN (**A, C**) ou d'AMEL (**B**). N, noyau.

**Figure 11**



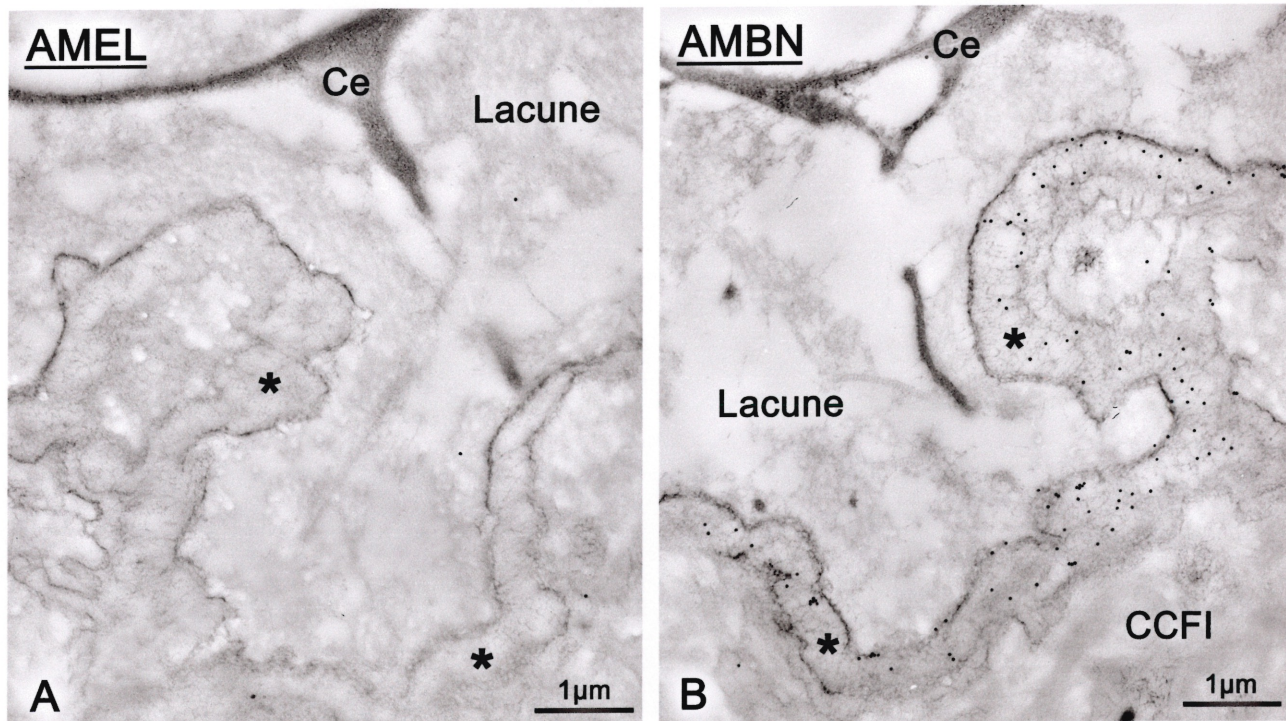
**Figure 12 :** Préparations immunocytochimiques avec des anticorps contre l'améloblastine (AMBN) **(A)**, la sialoprotéine osseuse (BSP) **(B)** et l'ostéopontine (OPN) **(C)** illustrant des cellules épithéliales (Ce) emprisonnées dans une lacune au sein du ciment cellulaire avec des fibres intrinsèques (CCFI), près de la dentine. **(A)** La lacune contient du matériel fibro-réticulé (agrandissement en haut à droite) ne contenant pas de particules d'or mais plutôt des précipités de décalcification. La lacune est bordée par une zone (astérix) riche en AMBN. Contrairement à l'AMBN, la BSP et l'OPN sont présentes dans la matrice cimentaire mais il ne semble pas y avoir d'accumulation préférentielle des particules d'or dans la zone bordant la lacune (astérix) **(B, C)**. N, noyau; tf, tonofilaments.

**Figure 12**



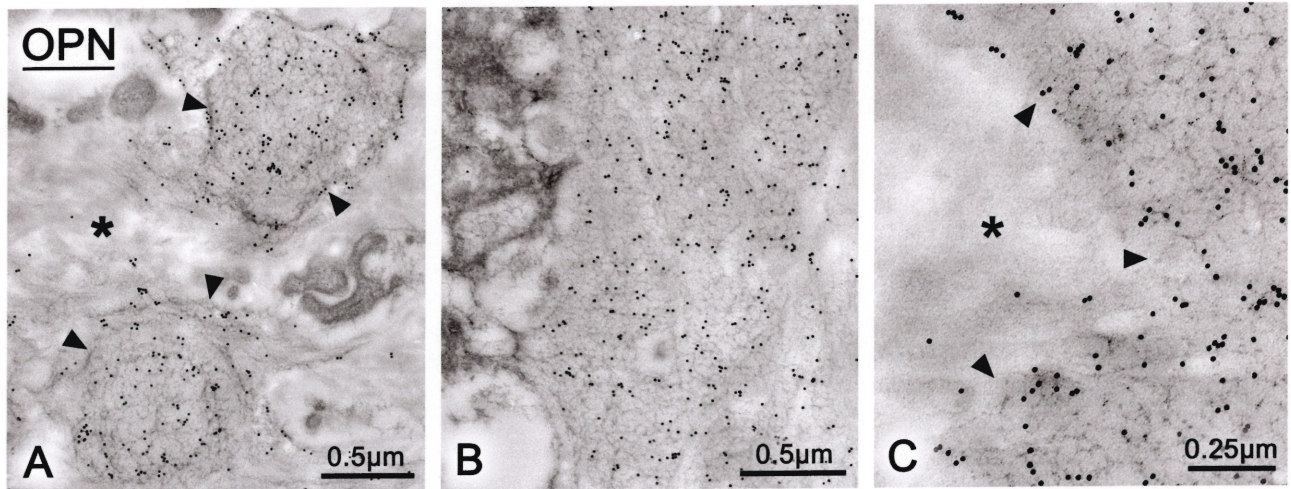


## Figure 13



*Photographies de microscopie électronique illustrant l'interface entre le ciment cellulaire avec des fibres intrinsèques et une lacune logeant une cellule épithéliale (Ce). Comparaison entre des coupes incubées avec des anticorps contre l'amélogénine (AMEL) (A) et l'améloblastine (AMBN) (B). AMEL n'est pas présente dans la zone bordant la lacune (astérix) (A), alors que l'AMBN se concentre dans le matériel réticulaire et occasionnellement sur les lignes électro-denses (B).*

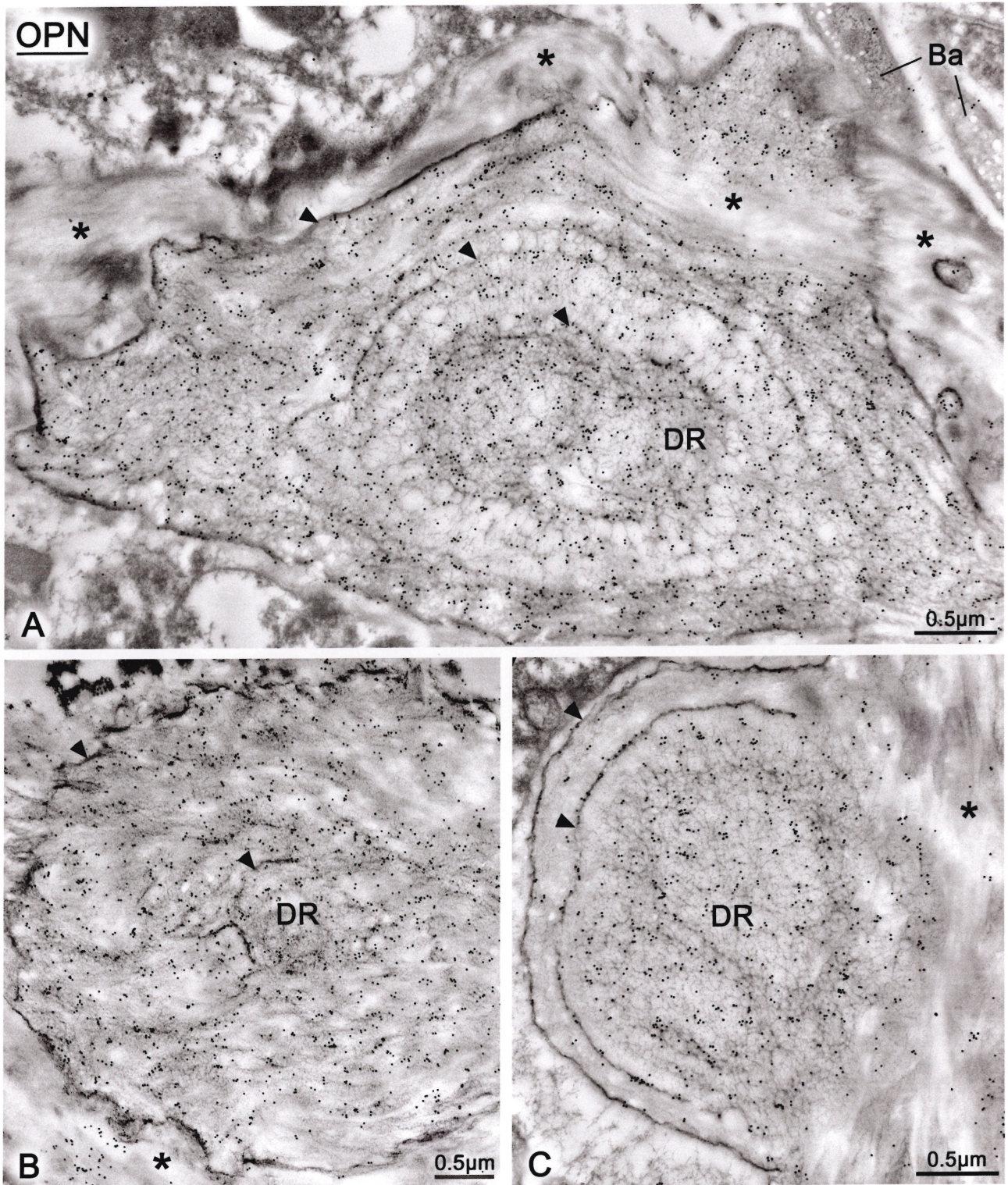
## Figure 14



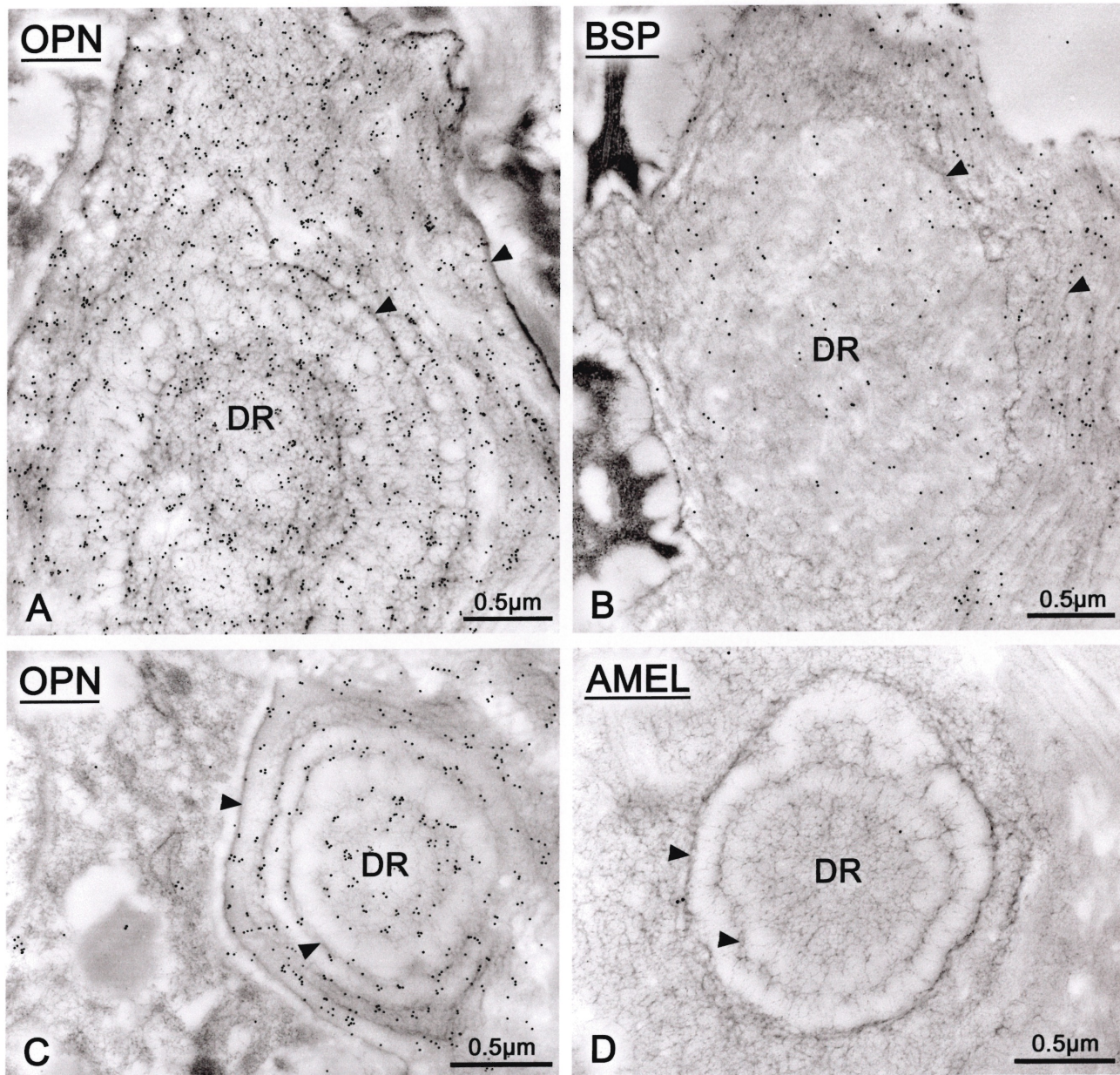
*Préparations immunocytochimiques avec un anticorps contre l'ostéopontine (OPN) illustrant le marquage de la dentine réparatrice (A-C). La dentine réparatrice est constituée d'une juxtaposition de deux types de tissu. D'une part, on observe un matériel riche en OPN, (têtes de flèches) mais pauvre en fibres de collagène (A-C), ayant un aspect de globules (A) ou de masses plus étendues (B, C). D'autre part, au contact de cette matrice est apposée une zone (astérix) contenant des fibres de collagène (régions électron-claires) et du matériel interfibrillaire (régions électron-denses) réagissant faiblement avec l'OPN (A, C).*

**Figure 15:** Préparations immunocytochimiques avec un anticorps contre l'ostéopontine (OPN) illustrant différents patrons globulaires de la dentine réparatrice (DR) (A-C). (A) : La formation de la dentine réparatrice peut débuter juste au contact des bactéries (Ba). La structure de la dentine peut consister en un globule de matériel soit réticulaire, pauvre en collagène (A, C), soit moins réticulaire, et contenant plus de fibres de collagène (zones électron-claires) (B). Le matériel réticulaire non collagénique à l'intérieur du globule apparaît riche en OPN. (A-C) : Ce type de globule peut contenir des lignes concentriques électron-denses (têtes de flèches). Il est bordé par une zone (astérix) abondante en fibres de collagène, associée à du matériel électron-dense pauvre en collagène, dans lequel les particules d'or sont soit absentes (A, B), soit présentes mais dispersées (C).

Figure 15

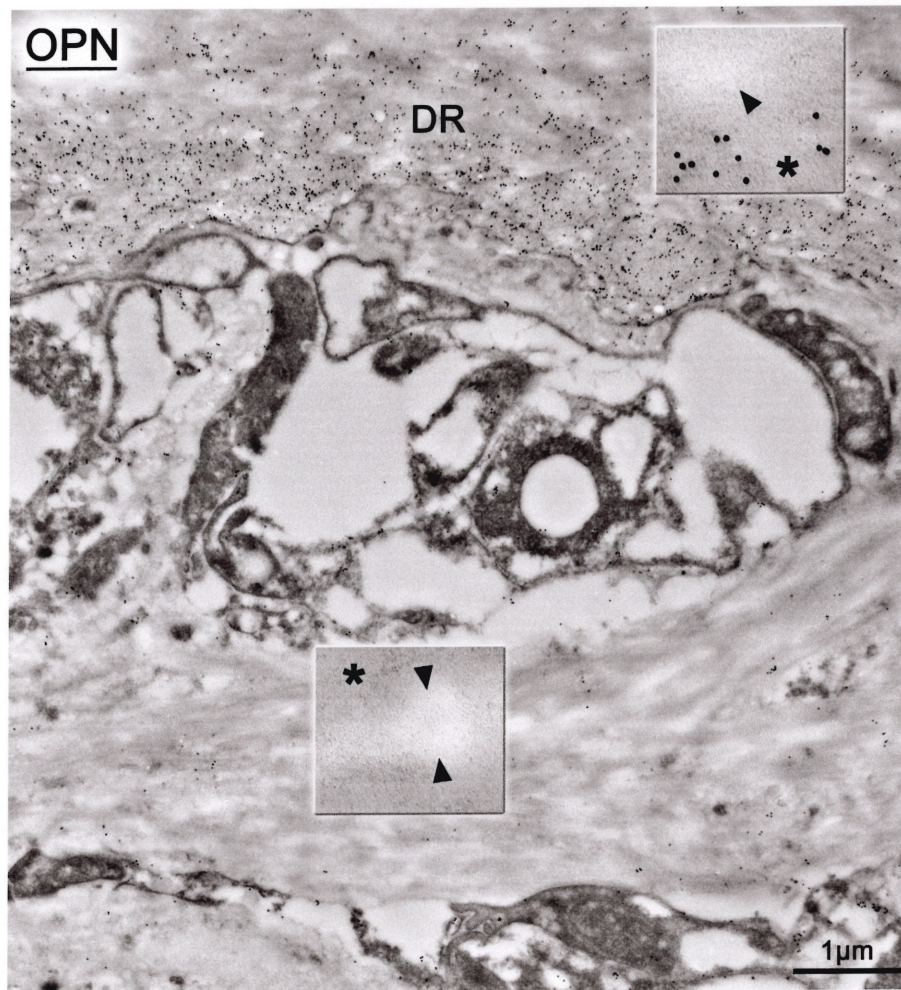


## Figure 16



*Comparaisons des préparations immunocytochimiques avec des anticorps contre l'ostéopontine (OPN) (A, C), la sialoprotéine osseuse (BSP) (B) et l'amélogénine (AMEL) (D) illustrant un patron globulaire de la dentine réparatrice (DR). L'OPN et la BSP s'accumulent dans les zones pauvres en collagène de la dentine réparatrice (A, C), en association avec les lignes concentriques électro-denses (têtes de flèches). Le marquage avec la BSP semble un peu moins intense que celui de l'OPN (B) alors qu'aucune particule d'or d'AMEL n'est présente dans la dentine réparatrice (D).*

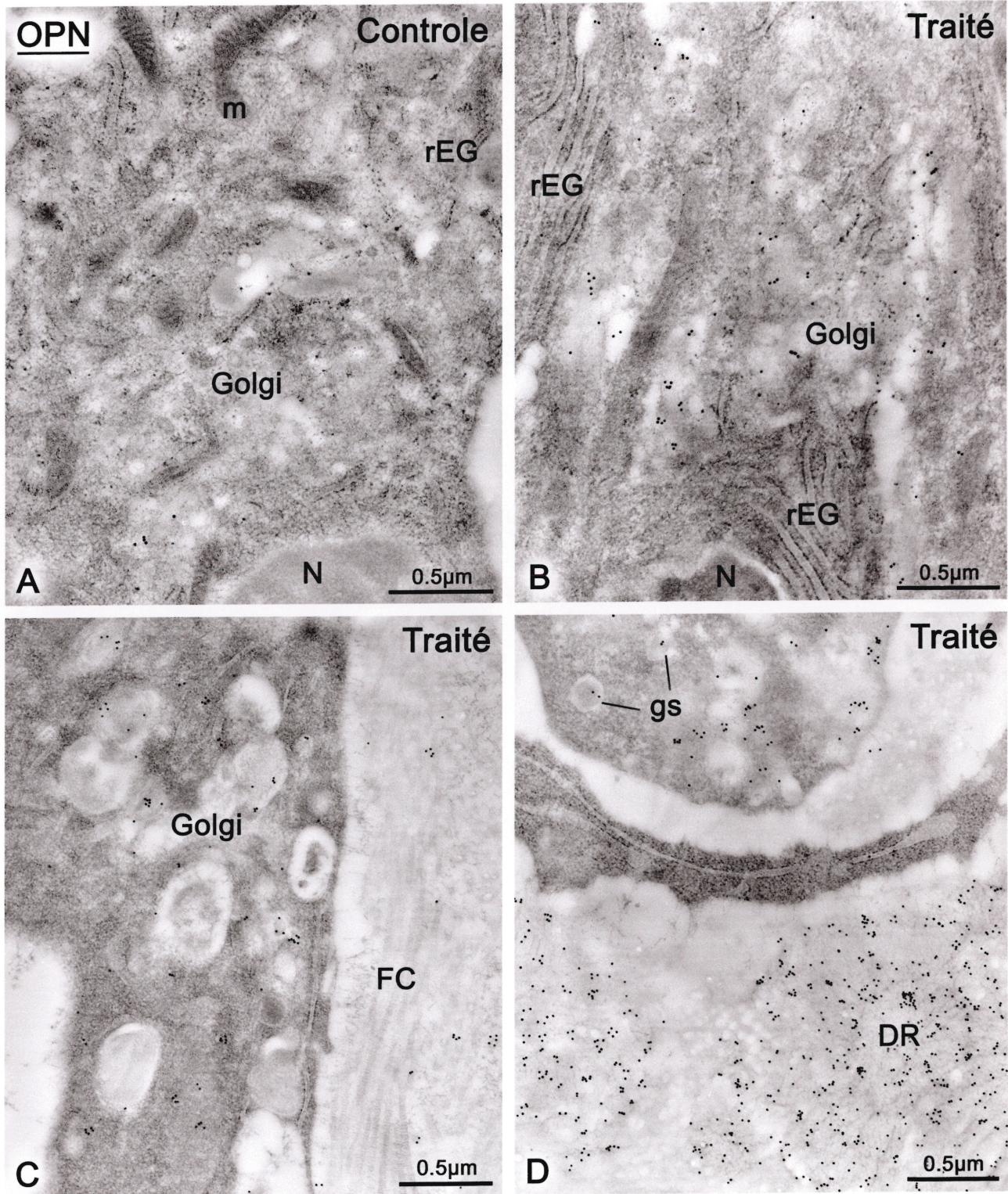
## Figure 17



*Photographie de microscopie électronique illustrant la dégénérescence d'une cellule au sein de la dentine réparatrice (DR). La coupe est incubée avec un anticorps contre l'ostéopontine (OPN). La cellule dégénérante est caractérisée par une perte de son intégrité structurale. Dans la dentine réparatrice, juste au-dessus de la cellule, on aperçoit une région pauvre en collagène mais plus riche en matériel afibrillaire dans lequel se concentre l'OPN. Au-dessus de cette région et au-dessous de la cellule (agrandissements), on aperçoit des zones plus riches en collagène (têtes de flèches). Le matériel afibrillaire (astérix) de ces zones est abondant en OPN, au-dessus de la cellule (agrandissement supérieur), mais peu de particules d'or sont détectées sur ce matériel situé au-dessous de la cellule (agrandissement inférieur).*

**Figure 18 :** Préparations immunocytochimiques avec un anticorps contre l'ostéopontine (OPN) illustrant un odontoblaste, situé dans la moitié apicale de la racine (A), et des cellules mononucléées, associées à la production de dentine réparatrice, possédant des caractéristiques fibroblastiques (B-D). (A) : L'odontoblaste est une cellule mononucléée cylindrique avec une organisation polarisée des organites cytoplasmiques. Le noyau (N) occupe la partie proximale du corps cellulaire alors que le large réticulum endoplasmique granuleux (rEG), les mitochondries (m) et l'appareil de Golgi, sur lequel peu de particules d'or d'OPN sont présentes, ont une localisation supra-nucléaire. (B-D) : Les cellules associées à la formation de la dentine réparatrice (DR) présentent une immunoréactivité importante de l'appareil de Golgi et des granules de sécrétion (gs) pour l'OPN. Ces cellules sont associées à une matrice soit fibreuse (C) soit réticulaire (D), pauvre en fibres de collagène, avec un matériel afibrillaire riche en OPN. FC, fibres de collagène.

**Figure 18**





D I S C U S S I O N

## 5. DISCUSSION

La compression locale du parodonte lors des mouvements orthodontiques entraîne une résorption des tissus minéralisés radiculaires avec une destruction du cément voire de la dentine. Cette résorption est éventuellement suivie par une étape d'apposition tissulaire. Les mécanismes responsables de cette réparation ne sont pas connus et deviennent alors un enjeu pour éviter la destruction permanente d'une partie de la racine. À ce sujet, la littérature décrit la possibilité d'activer certaines cellules pour le remaniement ou la guérison parodontale. Il nous paraissait donc intéressant d'approfondir l'une de ces études dans l'optique de développer des approches biologiques dans les techniques orthodontiques.

Les tissus minéralisés à base de collagène consistent en deux phases : inorganique (carbonate-apatite) et organique (protéines de la matrice collagénique et non collagénique). Bien que la matrice organique soit constituée en majeure partie de fibres de collagène (revue dans Veis *et al.*, 1987), depuis quelques années, l'attention s'est plutôt portée sur la caractérisation et le rôle des protéines non collagéniques (PNCs) dans les tissus calcifiés normaux et pathologiques. Ce domaine est en plein essor grâce

notamment au développement de meilleurs outils tels les anticorps, des sondes d'ADNc et les constructions génomiques qui permettent de déterminer non seulement le patron et la régulation de l'expression de ces protéines mais également leurs potentielles fonctions au sein de divers tissus (revue de Robey, 1996). Les études immunocytochimiques menées sur l'os et le ciment ont permis de déterminer le patron de distribution de deux PNCs majeures, la sialoprotéine osseuse (BSP) et l'ostéopontine (OPN) (Nanci, 1999). De la même façon que pour l'os, ces deux PNCs sont impliquées dans différents aspects de la cémentogenèse tels la migration et l'attachement cellulaires à la surface radiculaire, la différenciation cellulaire et la minéralisation (Somerman *et al.*, 2000). Contrairement à l'os, une composante épithéliale est associée au ciment, la gaine épithéliale de Hertwig (GEH), élément indispensable au développement radiculaire (Bosshardt et Selvig, 1997). Même si aucun produit épithélial n'est détecté de façon consistante sur les racines de dent humaine (Bosshardt et Schroeder, 1996), certaines données chez le rat suggèrent néanmoins que ces cellules épithéliales déposent des protéines de type amélaire le long de la surface dentinaire qui seraient impliquées dans l'initiation de la cémentogenèse (Glazman et Slavkin, 1974). L'attention se porte de plus en plus sur l'éventuelle implication des protéines amélaire sur la régénération parodontale mais les résultats ne font pas l'unanimité (Zeichner-David, 2001). Une manière de tester ce concept a été proposée par

l'application d'un modèle d'inflammation pulpaire qui stimulerait les cellules épithéliales, et notamment les restes épithéliaux de Malassez, qui formeraient alors une nouvelle matrice de ciment (Hamamoto *et al.*, 1989a). De plus, ce modèle présente l'avantage de stimuler la formation d'un autre tissu de réparation, la dentine réparatrice dont la composition n'est toujours pas élucidée et dont la formation serait également influencée par des protéines amélaire. La caractérisation immunocytochimique de ces deux tissus trouve ici toute son importance afin de mieux comprendre les mécanismes sous-jacents à la réparation tissulaire de matrices potentiellement détruites lors des résorptions radiculaire.

Dans cette présente étude, nous avons utilisé la capacité de grande résolution du microscope électronique associée avec l'immunocytochimie à l'or colloïdal (revue dans Bendayan, 1995) pour détecter la présence et la distribution de certaines protéines non collagéniques (PNCs) au sein des tissus minéralisés radiculaire. Nous nous sommes particulièrement intéressés PNCs les plus généralement retrouvées au sein des tissus collagéniques et non collagéniques, à savoir l'OPN, la BSP, l'AMEL et l'AMBN, et nous avons identifié certains sites d'accumulation de ces protéines. La distribution de celles-ci et leurs implications sont discutées dans le paragraphe suivant.

### 5.1. Le ciment

Conformément aux précédentes études immunocytochimiques, l'OPN et la BSP sont très abondantes dans le ciment (McKee *et al.*, 1996; Bosshardt *et al.*, 1998) et sont préférentiellement associées à un matériel électron-dense, réticulaire ou non, distribué entre les fibres de collagène à travers la matrice cimentaire minéralisée. Deux facteurs déterminent l'accumulation des protéines non collagéniques (PNCs) au sein des tissus minéralisés. Dans les tissus à base de collagène, la transition entre la matrice non minéralisée et la matrice minéralisée se produit au niveau du front de minéralisation, un site d'accumulation des diverses PNCs et de croissance des cristaux d'hydroxyapatite à l'intérieur et entre les fibres de collagène (revue de Christoffersen et Landis, 1991). Le patron de distribution des PNCs va donc dépendre de l'assemblage des fibres de collagène (Nanci, 1999; Bosshardt et Nanci, 2000). On peut donc différencier la structure du CAFÉ qui contient des fibrilles de collagène alignées et regroupées en faisceaux bien organisés (Bosshardt et Schroeder, 1991a;b) avec celle du CCFI où l'orientation des fibres de collagènes est plus désordonnée. La structure et la composition du CCFI sont très similaires à celles de l'os (revue de Bosshardt et Selvig, 1997). Le second facteur qui entre en jeu pour la distribution des PNCs est la vitesse de formation et d'accumulation des fibres (Nanci, 1999). L'intensité des marquages pour la BSP et l'OPN semble plus importante et homogène au sein

du CAFE que dans le CCFI. Puisque la matrice collagénique est déposée plus rapidement dans le cas du CCFI que du CAFE (revue de Bosshardt et Schroeder, 1996), il est donc concevable que les PNCs aient moins de temps alors pour s'accumuler dans le CCFI. La rapidité de formation du CCFI entraîne des inclusions de cémentocytes présentant différentes morphologies et une immunoréactivité occasionnelle de la lacune cellulaire pour les PNCs (McKee *et al.*, 1996).

## **5.2. Les protéines amélares**

Beaucoup d'espoir est fondé sur ces protéines qui font de plus en plus l'objet d'études proposant leur rôle dans la régénération des tissus calcifiés (Zeichner-David, 2001). L'amélogénine (AMEL), principale protéine amélaire, existe sous plusieurs formes, d'où la difficulté de détection et les différences de résultats entre les études. Les amélogénines subissent une série complexe de modifications protéolytiques extracellulaires qui clivent progressivement la molécule parentale en plusieurs fragments peptidiques altérant ainsi ses propriétés physiques (Fincham *et al.*, 1991). Parmi les différents anticorps disponibles, il a été montré que l'anticorps dirigé contre le fragment de 24kDa présente un spectre de reconnaissance large et réagit à la fois avec la protéine parentale et plusieurs isoformes (Chen *et al.*, 1995; Nanci *et al.*, 1996a). Nous

avons donc utilisé cet anticorps afin de maximiser nos chances de détecter une quelconque forme de cette protéine.

### **5.3. La jonction dentine-cément**

La jonction dentino-cémentaire est un site où l'ostéopontine (OPN) et la sialoprotéine osseuse (BSP) s'accumulent dans un patron variable en fonction de la topographie de la surface et de l'arrangement des fibres de collagène du manteau dentinaire et du cément (Bosshardt *et al.*, 1998). En ce qui concerne les molaires de rats, nous avons observé au niveau apical que la jonction entre la dentine et le CCFI est occupée par des lacunes renfermant des débris cellulaires. Plus on descend en direction apicale et plus ce sont des cellules épithéliales, dérivant de la gaine épithéliale de Hertwig, qui se retrouvent emprisonnées dans ces lacunes dans le tiers apical. La zone bordant celles-ci est particulièrement intéressante puisqu'elle est très immunoréactive pour l'améloblastine (AMBN). Ces observations sont consistantes avec celles de Fong *et al.* (1996a), Bosshardt et Nanci (1998) et Fong et Hammarström (2000). Le marquage pour l'OPN et la BSP apparaît cependant plus diffus dans cette région. Bosshardt *et al.* (1998) ont d'ailleurs trouvé que le marquage de cette matrice bordant la lacune n'était pas constant. Cependant, dans la région cervicale, il semble y avoir une accumulation préférentielle de ces protéines non collagéniques (PNCs) à la jonction entre la dentine et le CAFE.

Cette portion interne du CAFE est caractérisée par une pauvreté en fibres de collagène et une accumulation dense d'OPN et de BSP qui avaient déjà été rapportée (McKee *et al.*, 1996; Bosshardt *et al.*, 1998). L'apparition de ces PNCs dans cette région et dans les sites de régénération parodontale a été proposée comme la première étape dans la formation de la matrice extracellulaire au cours de la cémentogenèse (Kawaguchi *et al.*, 2001).

#### **5.4. Activation des cellules épithéliales?**

Nos observations reflètent la variabilité des résultats de Hamamoto *et al.* (1996) où la formation d'îlots épithéliaux, ressemblant aux restes épithéliaux de Malassez, dans la région apicale n'était observée que dans approximativement 50% des molaires de rat au jour 7. Au jour 14, tous ces îlots présentaient un changement structural et étaient partiellement encerclés par le ciment, du côté parodontal, et par de l'ostéodentine, du côté pulpaire. Dans le but d'observer le début de la formation de ces tissus calcifiés et l'activation de ces cellules, nous avons alors estimé le temps d'observation au jour 11.

Les restes épithéliaux de Malassez prédominent dans la région interradiculaire en relation avec les zones de perforations dentaires, entraînant la formation de lésions parodontales (Kakehashi *et al.*, 1965; Hamamoto *et al.*, 1989a).



Exceptionnellement, des îlots épithéliaux sont observés associés avec une matrice cémentaire, en continuité avec le CCFI. Tagger et Massler (1975) avaient également observé ce tissu trois semaines après l'exposition pulpaire. Il s'agirait de l'initiation d'un ciment cellulaire de « réparation ». Cependant, les cellules ne ressemblent pas aux restes épithéliaux de Malassez décrits par Hamamoto *et al.* (1989a; 1996) et caractérisés par un noyau condensé et des organites cellulaires peu développés.

Les cellules épithéliales de la gaine épithéliale de Hertwig emprisonnées dans la jonction dentino-cémentaire semblent, dans certains cas où l'apex est largement ouvert, en continuité avec un groupe de cellules isolées situées dans la région apicale, partiellement ou complètement emprisonnées dans la périphérie du CCFI. Ces cellules ne présentent aucun marquage pour l'amélogénine (AMEL) ni l'améloblastine (AMBN) que ce soit pour les dents contrôles ou traitées. Cette observation confirme les données de Fong et Hammarström (2000).

### **5.5. Protéines amélares et dentine réparatrice**

Au niveau coronaire, les protéines amélares sont sécrétées très tôt au cours de l'amélogénèse, et ce, avant la formation du manteau dentinaire (Nanci *et al.*, 1992). Elles ont donc été proposées dans la signalisation épithélio-

mésenchymateuse et la formation initiale de dentine (Veis *et al.*, 2000). Cependant, la localisation des peptides de type amélogénine est limitée à la dentine et/ou aux odontoblastes de la couronne (Inai *et al.*, 1991; Nakamura *et al.*, 1994; Sawada et Nanci, 1995; Nebgen *et al.*, 1999, Veis *et al.*, 2000). L'absence d'une telle accumulation au niveau radiculaire suggérerait des mécanismes de formation et de structure distincts entre la dentine coronaire et la dentine radiculaire.

Il a cependant été proposé que ces protéines amélaire jouent un rôle dans la formation de la dentine réparatrice (Spahr *et al.*, 2001). L'améloblastine (AMBN) a été ainsi associée avec la dégénérescence des odontoblastes après un trauma pulpaire et transplantation dentaire (Spahr *et al.*, 2001). Nakamura *et al.* (2001) ont même montré, suivant un modèle de coiffage pulpaire, qu'un dérivé de la matrice amélaire (EMD) produisait plus de dentine réparatrice et ce, sans inflammation pulpaire, comparé à l'hydroxyde de calcium. Ces résultats sont prometteurs mais doivent être confirmés par un plus grand nombre d'études sur ce produit novateur. De fait, notre expérimentation n'a pas révélé la présence de protéines amélaire associées à la dentine réparatrice. Plusieurs éventualités peuvent être envisagées pour expliquer la différence entre nos résultats et ceux décrits dans la littérature : (1) Tout d'abord le type de protéine amélaire étudié; (2) ces protéines pourraient être sécrétées de façon

transitoire ou avoir une demi-vie courte et ne pas être détectée au moment de notre observation; (3) elles pourraient également être présentes mais en faible quantité non détectable. Une signalisation par les protéines amélaire n'est donc pas exclue, même si elle est transitoire. Une analyse biochimique pourrait être utile dans ce contexte ou même une étude échelonnée dans le temps nécessitant un échantillonnage important.

## **5.6. La dentine réparatrice**

### **5.6.1. Modèles expérimentaux**

Plusieurs modèles ont permis de décrire la cascade des événements cicatriciels conduisant à la formation de dentine réparatrice dans les pulpes traumatisées. Le modèle le plus utilisé et bien documenté est le coiffage pulpaire. La cavité pulpaire est préparée, la pulpe exposée est directement recouverte de différents matériaux de coiffage. Ensuite, un matériau de restauration vient refermer la cavité. L'inconvénient de cette procédure est que la réponse pulpaire dépend du matériau de coiffage utilisé (Pereira *et al.*, 2000). La transplantation dentaire représente un autre modèle de trauma pulpaire sans exposition pulpaire. Par conséquent, cette procédure évite l'infection par les agents pathogènes responsables de l'inflammation et/ou de la nécrose (Bergenholtz *et al.*, 1982) mais elle peut provoquer des résorptions inflammatoires associées ou non à une ankylose (Nishioka *et al.*, 1998).

Le matériau de coiffage de référence actuel est l'hydroxyde de calcium largement utilisé dans les cas d'inflammation pulpaire. Histologiquement, ce matériau induit la formation d'une zone de nécrose superficielle provoquant une légère irritation et stimulant ainsi le système de défense et de réparation de la pulpe et la formation d'un pont dentinaire (revue de Schroder, 1985). Cependant, les effets d'un tel traitement sont inconstants et variés incluant la formation de dentine réparatrice avec préservation de la vitalité pulpaire, la résorption pulpaire, la lésion périapicale et la formation excessive de la dentine réparatrice avec obturation de la chambre pulpaire (Foreman et Barnes, 1990). Certaines molécules bio-actives possédant une activité ostéogénique résultent également en la sécrétion d'une matrice fibrodentinaire qui secondairement induit la formation d'une dentine tubulaire. Parmi les molécules utilisées, on peut citer les facteurs de croissance tels les BMPs (*Bone morphogenetic proteins*) (Nakashima, 1990; 1994 Lianja *et al.*, 1993), le TGF- $\beta$  (*Transforming growth factor- bêta*) (Rutherford *et al.*, 1993; Hu *et al.*, 1998), l'EMD (Nakamura *et al.*, 2001) et même les protéines non collagéniques telles la sialoprotéine osseuse (BSP) (Decup *et al.*, 2000). Quoique l'effet stimulateur de ces molécules sur la réparation pulpaire soit indéniable, leur rôle régulateur direct sur l'expression du potentiel dentinogénique par les cellules pulpaires est moins évident. Les études *in vitro* permettent néanmoins

de préciser le rôle de certaines de ces molécules sur les cellules pulpaire (Magloire *et al.*, 1996). Melin *et al.* (2000) ont ainsi proposé que le TGF- $\beta$  puisse être directement impliqué dans la régulation de la prolifération, la migration et la production d'une matrice extracellulaire par les cellules pulpaire humaine. Cependant, la composition de la matrice calcifiée produite ne commence à être déterminée que depuis peu (Zhang *et al.*, 2000; Yoshida *et al.*, 2002).

### **5.6.2. Description de la DR**

La dentine réparatrice est un tissu polymorphe généralement moins riche en collagène que la dentine physiologique. Nos observations confirment l'étude immunohistochimique de coiffage pulpaire réalisée sur le chien (Zhang *et al.*, 2000) puisque le matériel afibrillaire de la dentine réparatrice est riche en BSP et OPN que l'on retrouve également en grande quantité dans l'os et le ciment. Il semble donc que l'on ait activé directement ou indirectement certains produits par l'inflammation pulpaire puisque la structure de la dentine réactionnelle est plus proche de celle d'un os embryonnaire que celle d'une dentine physiologique. Ce tissu se forme très rapidement et semble protéger la pulpe de l'infiltrat bactérien plutôt que représenter uniquement un tissu de cicatrisation, comme le prétendent certains auteurs tels Bergenholtz (1981). La présence d'un tissu conjonctif réactionnel limité au tiers cervical constitue

également une barrière contre la propagation de l'infiltrat bactérien. Fait intéressant, l'épaisseur de la dentine réparatrice est plus importante dans la région apicale. Il semble donc que sa formation débute à l'apex c'est-à-dire à l'opposé de la lésion et de l'infiltrat bactérien. Nos résultats diffèrent de ceux de Kakehashi *et al.* (1965) qui avaient observé la formation de dentine réparatrice uniquement sur des rats axéniques (*germ-free*), alors qu'une nécrose a envahi le tissu pulpaire des rats conventionnels contrôles. De plus, la majorité des études utilise ce modèle d'exposition pulpaire pour étudier les lésions périapicales (Tagger et Massler, 1975; Yu et Stashenko, 1987; Yamasaki *et al.*, 1994). Leurs résultats indiquent que la nécrose pulpaire et la lésion périapicale apparaissent entre le 7<sup>ème</sup> et le 14<sup>ème</sup> jour. Alors que nous n'avons observé aucune lésion périapicale au jour 11. Cette divergence de résultats peut s'expliquer par l'utilisation de rats plus jeunes dans notre étude et donc avec une capacité de défense cellulaire plus rapide.

### 5.6.3. Distribution des protéines non collagéniques

La formation de dentine réparatrice s'accompagne d'une disparition des odontoblastes, survenant également dans les lésions carieuses établies (Bergenholtz, 1981) et l'exposition de la couche de pré-dentine sous-jacente. Aucun signe de résorption ne semble associé à la dénudation de cette surface. Par contre, cette couche non calcifiée de pré-dentine disparaît également et semble être remplacée par une zone intermédiaire minéralisée contenant du collagène et enrichie en ostéopontine (OPN) et en sialoprotéine osseuse (BSP). Cette zone aurait des dimensions similaires à celles de la pré-dentine. Il semblerait donc que le front de minéralisation ait été mis à nu et pourrait ainsi disposer des sels minéraux contenus dans le liquide interstitiel pour étendre la déposition minérale à la pré-dentine pré-existante. La dentine réparatrice est également riche en OPN et BSP. Ces données sont concordantes avec les analyses immunohistochimiques précédentes réalisées sur le chien (Zhang *et al.*, 2000) et l'humain (Yoshida *et al.*, 2002). L'origine des protéines non collagéniques (PNCs) retrouvées dans le tissu reste à déterminer avec précision mais plusieurs cellules peuvent en être la source, telles les cellules inflammatoires ou les fibroblastes pulpaire. Il s'agirait alors soit d'une sécrétion dirigée soit d'une adsorption des molécules circulantes sur ce front, grâce à leur affinité pour l'hydroxyapatite (revue de Robey, 1996) permettant

de réguler la minéralisation. L'intensité du marquage pour la BSP semble moins importante que pour l'OPN. Ces données seraient concordantes avec celles de Zhang *et al.* (2000) qui montrent une expression constante de l'OPN alors que celle de la BSP diminue avec le temps. Cette différence de concentration pourrait être en partie expliquée par la fonction de la BSP, considérée comme un nucléateur de la formation d'hydroxyapatite. De plus, la BSP semble stimuler la formation de dentine réparatrice lorsqu'elle est implantée dans la pulpe (Decup *et al.*, 2000). Nos résultats sont consistants avec ceux de Spahr *et al.* (2001) puisque nous n'avons détecté aucune protéine amélaire au sein de la matrice de dentine réparatrice. Spahr *et al.* (2001) ont cependant suggéré que l'améloblastine (AMBN) ait un rôle transitoire dans l'initiation de la formation de cette dentine.

#### **5.6.4. Facteurs responsables de la formation de la DR**

La littérature décrit de nombreux agents responsables de la formation de la dentine réparatrice. Le caractère acide de la lésion carieuse dénature les protéines de la matrice dentinaire qui seront ensuite dégradées par des peptidases provenant des bactéries présentes dans la lésion (McKay, 1976). Par conséquent, des molécules de la matrice extracellulaire dentinaire sont relarguées. La purification de molécules extractibles à la guanidine-EDTA de la dentine humaine a montré la présence de facteurs de croissance tels le TGF-



$\beta$  (Finkelman *et al.*, 1990) ou la BMP (Bessho *et al.*, 1991). En effet, l'implantation de dentine déminéralisée dans le muscle et le tissu conjonctif sous-cutané de rat induit la formation d'un tissu cartilagineux (Inoue *et al.*, 1986). De plus, elle peut induire la formation de dentine réparatrice lorsqu'elle est implantée dans des pulpes exposées (Smith *et al.*, 1990). Les polypeptides induisant cette activité chondrogénique *in vitro* ne correspondent cependant ni à la famille des BMPs ni à celles des TGF- $\beta$  (Amar *et al.*, 1991). Récemment, des données biochimiques (Nebgen *et al.*, 1999) ont montré qu'il s'agirait de polypeptides de type amélogénine de faible poids moléculaire. Ces facteurs, séquestrés dans la matrice dentinaire, peuvent être libérés durant la phase de déminéralisation du processus carieux et pourraient stimuler les odontoblastes (Smith *et al.*, 1994) et/ou les cellules pulpaires (Tziafas *et al.*, 1992) pour former la dentine réparatrice.

Des agents inducteurs sont donc nécessaires pour la formation du pont dentinaire tels que les copeaux de dentine dus à la préparation de la cavité (Mjor *et al.*, 1991) ou le micro-environnement de la chambre pulpaire (revue de Tziafas, 1995). La réparation pulpaire dépend des interactions entre le type de trauma, les réponses du système neurovasculaire pulpaire et l'état fonctionnel/structural du tissu pulpaire. La première couche de tissu cicatriciel formé (fibrodentine / ostéodentine) est irrégulière, amorphe, atubulaire et

contient des inclusions cellulaires particulièrement dans la région apicale constituant non seulement une barrière contre la pénétration des bactéries (Mjor, 1985), mais cette matrice fibrodentinaire vascularisée jouerait également un rôle dans l'interaction épigénique induisant l'histodifférenciation des odontoblastes (Baume, 1980). Au cours du développement embryonnaire de la couronne, cette fonction est exercée par l'épithélium amélaire et la membrane basale associée (Ruch, 1985; Thesleff *et al.*, 1996). Cette matrice de transition, observée au cours du processus initial de cicatrisation pulpaire, suggère un mécanisme commun régulant les réparations osseuses et dentinaires (Magloire *et al.*, 1992). Selon le degré de lésion des odontoblastes, ils peuvent soit s'atrophier complètement, soit continuer une fonction non coordonnée manifestée par leur dépolarisation et la formation rapide d'une matrice entraînant leur auto-inclusion et donc simulant l'ostéodentine (Baume, 1980).

Les investigations à long terme montrent clairement que des tubuli dentinaires se forment ultérieurement (Heys *et al.*, 1990). La dentine réparatrice proprement dite, caractérisée par la présence de larges tubules, est alors synthétisée par des cellules de type odontoblaste.

### 5.6.5. Cellules responsables de la formation de la DR

Jusqu'à présent, aucune étude n'a évalué la nature de la population cellulaire responsable de la formation de la dentine réparatrice. Plusieurs groupes de cellules seraient impliqués dans la formation de la dentine réparatrice et seraient capables de se différencier en cellules de type odontoblaste ou en odontoblastes de remplacement. Deux théories s'affrontent : (1) la première théorie supporte la différenciation de cellules prédéterminées, situées dans la zone sub-odontoblastique riche en cellules, qui ne subissent pas de réplication de leur ADN (Torneck et Wagner, 1980; Ruch, 1985; Veis, 1985) (2) la seconde théorie suggère que le remplacement des odontoblastes lésés soit effectué par des cellules provenant du coeur de la pulpe coronaire capables de répliquer leur ADN lors de leur migration vers le site de réparation. Ces cellules dériveraient soit des fibroblastes pulpaire, soit des cellules endothéliales, soit des péricytes, soit des cellules mésenchymateuses non différenciées (Fitzgerald, 1979; Yamamura *et al.*, 1980; Fitzgerald *et al.*, 1990). Lorsque la pulpe est affectée, ces deux mécanismes entreraient en jeu pour la formation du pont dentinaire (Yamamura, 1985). D'une part, les cellules pulpaire endothéliales et les péricytes situés au coeur de la pulpe se dé-différencient en cellules mésenchymateuses non différenciées. Ces cellules sont ensuite capables de se différencier en odontoblastes sans l'influence des cellules épithéliales de l'organe amélaire et de la membrane basale requise

pour la dentinogenèse initiale. D'autre part, les cellules pulpaire adjacentes au site d'amputation, après plusieurs mitoses, se différencient en odontoblastes pour former le pont dentinaire. Cependant, si les cellules sont placées en dehors de leur environnement pulpaire ou après une ablation importante de la dentine circumpulpaire, les cellules pulpaire ne vont jamais exprimer le phénotype de cellules de type odontoblastique (Yamamura, 1985; Tsuji *et al.*, 1987).

Les cellules associées à la formation de cette dentine sont difficiles à définir puisque généralement, on ne distingue que deux types de cellules au cours du processus de réparation pulpaire : (1) les cellules de type odontoblastique; (2) les fibroblastes pulpaire. Les critères permettant de définir les cellules différenciées de type odontoblastique ne sont pas clairement déterminés dans la littérature. Ces cellules sont souvent identifiées uniquement par leur apposition d'une matrice tubulaire. Seuls des marqueurs biochimiques spécifiques de l'activité odontoblastique et des protéines non collagéniques spécifiques de la dentine devraient déterminer le caractère odontoblastique de ces cellules (revue de Tziafas, 1995). Cependant, les cellules associées à la formation de la fibrodentine ressemblent plus aux cellules pulpaire non différenciées. Dans notre étude, les cellules associées à la dentine réparatrice présentent une morphologie de type fibroblastique avec cependant un

réticulum endoplasmique granuleux et un appareil de Golgi bien développés ainsi que de nombreux granules de sécrétion. L'immunoréactivité de ces deux derniers organites pour l'ostéopontine (OPN) semble préconiser une origine plutôt pulpaire. Yokota *et al.* (1992) ont effectivement montré que les cellules pulpaires clonées produisent et sécrètent l'OPN mais pas la phosphoryne, principale protéine non collagénique de la dentine. L'OPN pourrait donc être considérée comme un marqueur différentiel important des cellules pulpaires. D'autres données sont cependant à considérer. Dans certains cas, l'ostéopontine et la sialoprotéine osseuse sont synthétisées par des cellules locales qui vont être activées. Les cellules des carcinomes mammaires sont un exemple de ce changement de l'expression phénotypique (Bellahcène et Castronovo, 1997). Nous pouvons alors supposer qu'au moment de notre observation, les cellules pulpaires sont activées pour former la matrice de dentine réparatrice.

La présence de certaines protéines amélaire au sein de la racine semble en accord avec les précédentes études suggérant l'implication de ces protéines dans la cémentogenèse et la réparation parodontale. Cependant, ces protéines sont associées avec les cellules épithéliales emprisonnées au sein de la jonction dentino-cémentaire, caractéristique que l'on ne retrouve pas dans toutes les espèces, notamment chez l'humain, ce qui remet en cause

l'importance de ces produits épithéliaux dans la formation ou le maintien de la racine. De plus, aucune perturbation de la formation radiculaire n'est notée chez les souris et les rats présentant un *knock-out* de l'amélogénine (Gibson *et al.*, 2001) et de l'améloblastine (Nanci *et al.*, données non publiées). Cependant, la formation cémentaire peut être divisée en trois régions distinctes. Les différences entre le CAFE et le CCFI sont bien documentées (Bosshardt et Schroeder, 1996) bien que l'origine des cellules impliquées dans leur formation ne soit pas tout à fait élucidée. Une troisième région, que nous proposons, située à l'extrémité radiculaire est en étroite relation avec les cellules épithéliales de la gaine épithéliale de Hertwig. Cette observation peut expliquer en partie l'efficacité des protéines amélaire dans la régénération du parodonte même si notre étude n'a pas permis de les détecter.

### **5.7. Potentiel de réparation tissulaire « naturelle »**

Ce n'est certes pas la première fois que la réparation « naturelle » des tissus dentaires est évoquée dans la littérature. L'étude de Tagger et Massler (1975) qui décrit la séquence des événements survenant après exposition pulpaire et ce, sur des intervalles allant de 2 jours à 1 an, révèle même un remarquable potentiel de réparation des tissus périapicaux sur certaines dents. L'idée de pouvoir contrôler les mécanismes responsables de cette réparation est très attrayante et ne se limite pas au seul domaine de l'orthodontie. Nous avons

tenté d'examiner ce processus de plus près en se basant sur un modèle suggérant l'implication de cellules épithéliales dans la formation d'une nouvelle matrice cémentaire. Ce concept est réellement nouveau d'autant que l'origine des cémentoblastes est encore sujette à controverse et il est maintenant proposé que ces cellules proviennent d'une transformation épithélio-mésenchymateuse. Les protéines amélaire, un produit généralement épithélial, sont de plus en plus proposées pour la réparation tissulaire. Quoique que nos données confirment la capacité des cellules pulpaires à se réparer et à former une matrice atubulaire de dentine réparatrice enrichie de protéines non collagéniques osseuses, la formation de ciment n'apparaît que rarement. Le temps d'observation choisi semble coïncider avec le début de cette formation et les cellules de la gaine épithéliale de Hertwig (GEH) seraient associées à ce tissu. La seule région dans laquelle les protéines amélaire sont détectées est en rapport avec la présence de cellules de la GEH emprisonnées dans la jonction dentino-cémentaire. Des études biochimiques complémentaires ou échelonnées dans le temps, nécessitant un échantillonnage considérable, s'avèreraient utiles pour déterminer la présence ou non de protéines amélaire dans les matrices étudiées et évaluer la séquence des événements se déroulant dans ce modèle inflammatoire. En effet, seule une connaissance détaillée des mécanismes impliqués dans cette réparation nous permettrait d'activer ce processus, et pourquoi pas, d'obtenir une obturation complète du canal

radiculaire et éviter ainsi les traitements canauxaires et l'utilisation de tenons, parfois responsables de fractures radiculaires.

### **5.8. Perspectives futures**

La formation des tissus dentaires est un domaine de recherche encore obscur. Seule la clarification des événements moléculaires et cellulaires apportera des possibilités de traitement « biologique », en stimulant la réparation de la dent par elle-même. Nous pourrions même envisager d'utiliser l'incisive de rat, qui présente l'avantage d'avoir une croissance continue, afin d'identifier les gènes potentiels impliqués dans la réparation dentaire. Depuis l'analyse histologique de Tagger et Massler (1975), des progrès importants dans les techniques d'étude de la composition et de la structure tissulaire ainsi que cellulaire sont apparus. Ces nouvelles techniques méritent d'être appliquées dans ce modèle afin de mieux comprendre les mécanismes qui régissent la réparation « naturelle » des tissus. La connaissance des événements se déroulant au cours de cette réparation tissulaire permettront en effet de déterminer les molécules impliquées directement ou indirectement dans ce processus. La thérapie génique *in situ* pourrait même entrer en jeu pour l'implantation de ces agents, dans le tissu et au moment approprié, par l'intermédiaire de vecteur de transfert viral portant la séquence d'ADN des agents sur lesquels on souhaiterait intervenir. Les applications futures sont vastes tant du point de



vue du contrôle du déplacement dentaire en orthodontie que, d'une manière plus globale, du développement des arcades dentaires grâce aux facteurs morphogénétiques. L'identification de ces facteurs se précise peu à peu et tend à converger vers un nombre plus limité de candidats, dont les protéines amélaire font partie. Nous pourrions même envisager l'implantation de ces protéines au sein de la pulpe exposée et réaliser des observations non seulement au niveau coronaire mais également au niveau radiculaire. Serons-nous un jour capable de restructurer un environnement dentaire et osseux global ?

C O N C L U S I O N

## 6. CONCLUSION

Le principe de « biomimétisme » dans le domaine de la médecine dentaire est de plus en plus d'actualité. Son application est maintenant proposée pour réparer ou régénérer des tissus lésés dans des maladies parodontales. Ces mêmes tissus radiculaires peuvent subir une destruction temporaire ou définitive lors de déplacements dentaires au cours d'un traitement orthodontique. Dans notre modèle d'inflammation pulpaire, nous avons pu mettre en évidence le potentiel initial considérable de la dent à cicatriser, en produisant, dans tous les cas observés, de la dentine réparatrice du côté pulpaire, et exceptionnellement, du ciment cellulaire du côté parodontal. L'analyse immunocytochimique démontre que la matrice extracellulaire de la dentine réparatrice est similaire à celle du ciment puisque toutes deux sont enrichies en protéines non collagéniques, telles la BSP et l'OPN. Cependant aucune protéine amélaire n'a été détectée au sein de ces matrices. Bien que ces résultats diffèrent de ceux décrits dans la littérature, plusieurs hypothèses peuvent être émises en rapport avec le type d'anticorps utilisé, la technique de détection ou encore le stade de formation du tissu. Les protéines amélaire, produits d'origine épithéliale, font l'objet de nombreuses études prometteuses mais encore controversées concernant leur implication dans la réparation des tissus. Leur utilisation est basée, avant tout, sur leur rôle spéculatif dans le

développement des tissus minéralisés tels la dentine et le ciment. Nos résultats ne peuvent exclure la présence de ces protéines mais seule une analyse biochimique et/ou échelonnée dans le temps pourra le déterminer. En fait, la seule région radiculaire observée dans laquelle on retrouve ces protéines est située dans la jonction dentino-cémentaire, où des cellules épithéliales sont emprisonnées. La présence de ces cellules, associées au développement radiculaire est une des particularités de la molaire de rat. Elles se retrouvent également parfois directement au contact du ciment, présumant leur implication dans la cémentogenèse. Cependant, l'existence de cémentocytes à l'intérieur de la matrice cémentaire suggère plutôt un phénomène de transformation épithélio-mésenchymateuse, qui n'a néanmoins jamais été mis en évidence. Même si toute extrapolation hâtive aux dents humaines doit être évitée, retenons tout de même que la dent représente un modèle essentiel, tant du point de vue de son développement que de son système de cicatrisation, pour apporter des données thérapeutiques afin de promouvoir une réparation « biologique » des tissus dentaires lésés mais aussi de contrôler ce processus.

B I B L I O G R A P H I E

## 7. BIBLIOGRAPHIE

1. Alatli I, Lundmark C, Hammarström L (1996) The localization of epithelial root sheath cells during cementum formation in rat molars. *J Periodont Res* 31(6) : 433-440
2. Amar S, Sires B, Sabsay B, Clohisy J, Veis A. (1991) The isolation and partial characterization of a rat incisor dentin matrix polypeptide with in vitro chondrogenic activity. *J Biol Chem* 5;266(13):8609-18
3. Baume LJ. (1980) The biology of pulp and dentine: a historic, terminologic-taxonomic, histologic-biochemical, embryonic and clinical survey *Monogr Oral Sci.*;8:159-182
4. Bellahcène A, Castronovo V. (1995) Increased expression of osteonectin and osteopontin, two bone matrix proteins, in human breast cancer. *Am J Pathol* 146(1):95-100
5. Bellahcène A, Castronovo V. (1997) Expression of bone matrix proteins in human breast cancer: potential roles in microcalcification formation and in the genesis of bone metastases. *Bull Cancer* 84(1):17-24
6. Bendayan M. (1995) Colloidal gold post-embedding immunocytochemistry. *Prog Histochem Cytochem* 29:1-159

7. Bergenholtz G, Cox CF, Loesche WJ, Syed SA (1982) Bacterial leakage around dental restorations: its effect on the dental pulp. *J Oral Pathol* 11:439-450
8. Bergenholtz G. (1981) Inflammatory response of the dental pulp to bacterial irritation. *J Endod* 7(3):100-104
9. Bessho K, Tanaka N, Matsumoto J, Tagawa T, Murata M. (1991) Human dentin-matrix-derived bone morphogenetic protein. *J Dent Res* 70(3):171-175
10. Boskey AL. (1996) Matrix proteins and mineralization: an overview. *Connect Tissue Res* 35(1-4):357-363
11. Bosshardt DD, Nanci A (1997) Immunodetection of enamel- and cementum-related (bone) proteins at the enamel-free area and cervical portion of the tooth in rat molars. *J Bone Miner Res* 12:367-379
12. Bosshardt DD, Nanci A. (1998) Immunolocalization of epithelial and mesenchymal matrix constituents in association with inner enamel epithelial cells. *J Histochem Cytochem* 46(2):135-142
13. Bosshardt DD, Nanci A. (2000) The pattern of expression of collagen determines the concentration and distribution of noncollagenous proteins along the forming root. In: *Chemistry and Biology of Mineralized Tissues* (eds: Goldberg M, Boskey A, Robinson C), Rosemont: American Academy of Orthopaedic Surgeons, 129-136

14. Bosshardt DD, Schroeder HE (1996) Cementogenesis reviewed: a comparison between human premolars and rat molars. *Anat Rec* 245:267-292
15. Bosshardt DD, Schroeder HE. (1991a) Initiation of acellular extrinsic fiber cementum on human teeth. A light- and electron-microscopic study. *Cell Tissue Res* 263(2): 311-324
16. Bosshardt DD, Schroeder HE. (1991b) Establishment of acellular extrinsic fiber cementum on human teeth. A light- and electron-microscopic study. *Cell Tissue Res* 263(2): 325-336
17. Bosshardt DD, Selvig KA. (1997) Dental cementum: the dynamic tissue covering of the root. *Periodontol* 2000 13:41-75
18. Bosshardt DD, Zalzal S, McKee MD, Nanci A. (1998) Developmental appearance and distribution of bone sialoprotein and osteopontin in human and rat cementum. *Anat Rec* 250(1):13-33
19. Brice GL, Sampson WJ, Sims MR. (1991) An ultrastructural evaluation of the relationship between epithelial rests of Malassez and orthodontic root resorption and repair in man. *Aust Orthod J* 12(2):90-94
20. Bronckers ALJJ, Farach-Carson MC., Van Waveren E, Butler WT. (1994) Immunolocalization of osteopontin, osteocalcin, and dentin sialoprotein during dental root formation and early cementogenesis in the rat. *J Bone Miner Res* 9 : 833-841



21. Brookes SJ, Kirkham J, Shore RC, Wood SR, Slaby I, Robinson C. (2001) Amelin extracellular processing and aggregation during rat incisor amelogenesis. *Arch Oral Biol* 46(3):201-218
22. Brookes SJ, Robinson C, Kirkham J, Bonass WA. (1995) Biochemistry and molecular biology of amelogenin proteins of developing dental enamel. *Arch Oral Biol* 40(1):1-14
23. Butler W.T., (1998) Dentin matrix proteins. *Eur J Oral Sci* 106 (suppl. 1): 204-210
24. Caffesse RG, Nasjleti CE, Anderson GB, Lopatin DE, Smith BA, Morrison EC. (1991) Periodontal healing following guided tissue regeneration with citric acid and fibronectin application. *J Periodontol* 62(1):21-29
25. Cerny R, Slaby I, Hammarström L, Wurtz T. (1996) A novel gene expressed in rat ameloblasts codes for proteins with cell binding domains. *J Bone Miner Res* 11(7): 883-891
26. Chen J, Sasaguri K, Sodek J, Aufdemorte TB, Jiang H, Thomas HF. (1998) Enamel epithelium expresses bone sialoprotein (BSP). *Eur J Oral Sci* 106 Suppl 1:331-336.
27. Chen WY, Nanci A, Smith CE. (1995) Immunoblotting studies on artifactual contamination of enamel homogenates by albumin and other proteins. *Calcif Tissue Int* 57(2):145-151

28. Cho MI, Garant PR. (1989) Radioautographic study of [ $^3\text{H}$ ] mannose utilization during cementoblast differentiation, formation of acellular cementum, and development of periodontal ligament principal fibers. *Anat Rec* 223: 209-222
29. Cho MI, Garant PR. (1996) Expression and role of epidermal growth factor receptors during differentiation of cementoblasts, osteoblasts, and periodontal ligament fibroblasts in the rat. *Anat Rec* 245(2):342-360
30. Christoffersen J, Landis WJ. (1991) A contribution with review to the description of mineralization of bone and other calcified tissues in vivo. *Anat Rec* 230(4):435-450
31. D'Errico JA, MacNeil RL, Takata T, Berry J, Strayhorn C, Somerman MJ (1997) Expression of bone associated markers by tooth root lining cells, in situ and in vitro. *Bone* 20:117-126
32. Dassule HR, McMahon AP. (1998) Analysis of epithelial-mesenchymal interactions in the initial morphogenesis of the mammalian tooth. *Dev Biol* 202(2):215-227
33. Decup F, Six N, Palmier B, Buch D, Lasfargues JJ, Salih E, Goldberg M. (2000) Bone sialoprotein-induced reparative dentinogenesis in the pulp of rat's molar. *Clin Oral Investig* 4(2):110-119.

34. Denhardt DT, Giachelli CM, Rittling SR. (2001) Role of osteopontin in cellular signaling and toxicant injury. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 41:723-749
35. Deutsch D, Palmon A, Fisher LW, Kolodny N, Termine JD, Young MF. (1991) Sequencing of bovine enamelin ("tuftelin") a novel acidic enamel protein. *J Biol Chem* 25;266(24):16021-16028
36. Diab MA, Stallard RE (1965) A study of the relationship between epithelial root sheath and root development. *Periodontics* 3: 10-14
37. Diamond M., Applebaum E. (1942) The epithelial sheath: Histogenesis and function. *J Dent Res* 21: 403-411
38. Fincham AG, Hu Y, Lau EC, Slavkin HC, Snead ML. (1991) Amelogenin post-secretory processing during biomineralization in the postnatal mouse molar tooth. *Arch Oral Biol* 36(4):305-317
39. Fincham AG, Moradian-Oldak J, Simmer JP. (1999) The structural biology of the developing dental enamel matrix. *J Struc Biol* 126:270-299
40. Finkelman RD, Mohan S, Jennings JC, Taylor AK, Jepsen S, Baylink DJ. (1990) Quantitation of growth factors IGF-I, SGF/IGF-II, and TGF-beta in human dentin. *J Bone Miner Res* 5(7):717-723
41. Fisher LW, Stubbs JT, Young MF (1995) Antisera and cDNA probes to human and certain animal model bone matrix noncollagenous proteins. *Acta Orthop Scand* 66:61-65

42. Fitchett JE, Hay ED. (1989) Medial edge epithelium transforms to mesenchyme after embryonic palatal shelves fuse. *Dev Biol* 131(2):455-474
43. Fitzgerald M, Chiego DJ Jr, Heys DR. (1990) Autoradiographic analysis of odontoblast replacement following pulp exposure in primate teeth. *Arch Oral Biol* 35(9):707-715
44. Fitzgerald M. (1979) Cellular mechanics of dentinal bridge repair using <sup>3</sup>H-thymidine. *J Dent Res* 58(Spec Issue D):2198-2206
45. Fong CD, Cerny R, Hammarström L, Slaby I. (1998) Sequential expression of an amelin gene in mesenchymal and epithelial cells during odontogenesis in rats. *Eur J Oral Sci* 106 Suppl 1:324-330
46. Fong CD, Hammarström L, Lundmark C, Wurtz T, Slaby I. (1996a) Expression patterns of RNAs for amelin and amelogenin in developing rat molars and incisors. *Adv Dent Res*. 10(2): 195-200
47. Fong CD, Hammarström L. (2000) Expression of amelin and amelogenin in epithelial root sheath remnants of fully formed rat molars. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 90(2):218-223
48. Fong CD, Slaby I, Hammarström L. (1996b) Amelin: an enamel-related protein, transcribed in the cells of epithelial root sheath. *J Bone Miner Res* 11(7): 892-898

49. Foreman PC, Barnes IE. (1990) Review of calcium hydroxide. *Int Endod J* 23(6):283-297
50. Frens G. (1973) Controlled nucleation for the regulation of the particle size in monodisperse gold solutions. *Nature Phys Sci* 241:20
51. Fukae M, Tanabe T, Murakami C, Dohi N, Uchida T, Shimuzu M. (1996) Primary structure of the porcine 89 kDa enamelin. *Adv Dent Res* 10:111-118
52. Ganss B, Kim RH, Sodek J. (1999) Bone sialoprotein. *Crit Rev Oral Biol Med* 10(1):79-98
53. Gestrelus S, Andersson C, Johansson AC, Persson E, Brodin A, Rydhag L, Hammarström L. (1997a) Formulation of enamel matrix derivative for surface coating. Kinetics and cell colonization. *J Clin Periodontol* 24(9 Pt 2):678-684
54. Gestrelus S, Andersson C, Lidstrom D, Hammarström L, Somerman M. (1997b) In vitro studies on periodontal ligament cells and enamel matrix derivative. *J Clin Periodontol* 24(9 Pt 2):685-692
55. Gestrelus S, Lyngstadaas SP, Hammarström L. (2000) Emdogain-periodontal regeneration based on biomimicry. *Clin Oral Investig* 4(2):120-125
56. Gibson CW, Yuan ZA, Hall B, Longenecker G, Chen E, Thyagarajan T, Sreenath T, Wright JT, Decker S, Piddington R, Harrison G, Kulkarni

- AB. (2001) Amelogenin-deficient mice display an amelogenesis imperfecta phenotype. *J Biol Chem* 24;276(34):31871-31875
57. Gilhuus-Moe O, Kvam E. (1972) Behaviour of the epithelial remnants of malassez following experimental movement of rat molars. *Acta Odontol Scand* 30(2):139-149
58. Glazman L, Bringas P, Slavkin HC (1986) Comparison of tryptophan-labeled constituents of developing rodent molar enamel matrix, non-enamel occlusal cusp, Hertwig's epithelial root sheath, and presumptive root furcation regions: light microscopic autoradiography. *J Craniofac Genet Dev Biol* 6:171-188
59. Glazman L.M., Slavkin H.C. (1974) Tryptophan incorporation into epithelial secretory products in developing rat molars. *J.Dent. Res.* 53 (abstract 408): 156
60. Glimcher MJ. (1989) Mechanism of calcification: role of collagen fibrils and collagen-phosphoprotein complexes in vitro and in vivo. *Anat Rec* 224(2):139-153
61. Griffith CM, Hay ED. (1992) Epithelial-mesenchymal transformation during palatal fusion: carboxyfluorescein traces cells at light and electron microscopic levels. *Development* 116(4):1087-1099

62. Grupe HE Jr, ten Cate AR, Zander HA. (1967) A histochemical and radiobiological study of in vitro and in vivo human epithelial cell rest proliferation. *Arch Oral Biol* 12(12):1321-1329
63. Hamamoto Y, Nakajima T, Ozawa H, Uchida T. (1996) Production of amelogenin by enamel epithelium of Hertwig's root sheath. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 81 (6) :703-709
64. Hamamoto Y, Nakajima T, Ozawa H. (1989a) Histological changes in periodontal tissues of rat molars following perforation of the pulp and its floor. *Shika Kiso Igakkai Zasshi* 31(6):627-637
65. Hamamoto Y, Nakajima T, Ozawa H. (1989b) Ultrastructure of epithelial rests of Malassez in human periodontal ligament. *Arch Oral Biol* 34(3):179-185
66. Hammarström L, Heijl L, Gestrelus S. (1997) Periodontal regeneration in a buccal dehiscence model in monkeys after application of enamel matrix proteins. *J Clin Periodontol* 24(9 Pt 2):669-677
67. Hammarström L. (1997) Enamel matrix, cementum development and regeneration. *J Clin Periodontol* 24(9 Pt 2):658-668
68. Harrison JW, Roda RS. (1995) Intermediate cementum. Development, structure, composition, and potential functions. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 79(5):624-633

69. Hay ED (1995) An overview of epithelio-mesenchymal transformation. *Acta Anat (Basel)* 154:8-20
70. Heijl L, Heden G, Svardstrom G, Ostgren A. (1997) Enamel matrix derivative (EMDOGAIN) in the treatment of intrabony periodontal defects. *J Clin Periodontol* 24(9 Pt 2):705-714
71. Heikinheimo K, Begue-Kirn C, Ritvos O, Tuuri T, Ruch JV (1998) Activin and bone morphogenetic protein (BMP) signalling during tooth development. *Eur J Oral Sci* 106 (Suppl 1):167-173
72. Heritier M. (1982) Experimental induction of cementogenesis on the enamel of transplanted mouse tooth germs. *Arch Oral Biol* 27(2) : 87-97
73. Heys DR, Fitzgerald M, Heys RJ, Chiego DJ Jr. (1990) Healing of primate dental pulps capped with Teflon. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 69(2):227-237
74. Hopewell-Smith A. (1903) The histology and pathology of the teeth and associated parts. Dental Manufacturing Co., London
75. Hu CC, Fukae M, Uchida T, Qian Q, Zhang CH, Ryu OH, Tanabe T, Yamakoshi Y, Murakami C, Dohi N, Shimizu M, Simmer JP. (1997) Sheathlin: cloning, cDNA/polypeptide sequences, and immunolocalization of porcine enamel sheath proteins. *J Dent Res* 76(2):648-657



76. Hu CC, Hart TC, Dupont BR, Chen JJ, Sun X, Qian Q, Zhang CH, Jiang H, Mattern VL, Wright JT, Simmer JP. (2000) Cloning human enamelin cDNA, chromosomal localization, and analysis of expression during tooth development. *J Dent Res* 79(4):912-919
77. Hu CC, Zhang C, Qian Q, Tatum NB. (1998) Reparative dentin formation in rat molars after direct pulp capping with growth factors. *J Endod* 24(11):744-751
78. Inai T, Kukita T, Ohsaki Y, Nagata K, Kukita A, Kurisu K. (1991) Immunohistochemical demonstration of amelogenin penetration toward the dental pulp in the early stages of ameloblast development in rat molar tooth germs. *Anat Rec* 229(2) : 259-270
79. Inai T, Nagata K, Kukita T, Kurisu K (1992) Demonstration of amelogenin in the enamel-free cusps of rat molar tooth germs: immunofluorescent and immunoelectron microscopic studies. *Anat Rec* 233:588-596
80. Inoue T, Deporter DA, Melcher AH. (1986) Induction of chondrogenesis in muscle, skin, bone marrow, and periodontal ligament by demineralized dentin and bone matrix in vivo and in vitro. *J Dent Res* 65(1):12-22
81. Jande SS, Bélanger LF (1970) Fine structural study of rat molar cementum *Anat Rec* 167: 439-464
82. Jones SJ. (1981) Cement. In: Osborn J.W. (ed.): *Dental anatomy and embryology*, 193-205. Oxford: Blackwell

83. Kakehashi S, Stanley HR, and Fitzgerald RJ. (1965) The effects of surgical exposures of dental pulps in germ-free and conventional laboratory rats. *Oral Surg* 20:340-348.
84. Kawaguchi H, McKee MD, Nanci A (1995) Immunodetection of non-collagenous bone proteins at sites of root dentin repair, *AdvDent Res* 9(3) :32
85. Kawaguchi H, Ogawa T, Kurihara H, Nanci A. (2001) Immunodetection of noncollagenous matrix proteins during periodontal tissue regeneration. *J Periodontal Res* 36(4):205-213
86. Krebsbach PH, Lee SK, Matsuki Y, Kozak CA, Yamada KM, Yamada Y. (1996) Full-length sequence, localization, and chromosomal mapping of ameloblastin. A novel tooth-specific gene. *J Biol Chem* 271(8): 4431-4435
87. Kronfeld R. (1938) Coronal cementum and coronal resorption. *J Dent Res* 17: 151-159
88. Kvam E, Gilhuus-Moe O. (1970) Uptake of <sup>3</sup>H-thymidine by an epithelial rest in the periodontal membrane. A preliminary report. *Acta Odontol Scand* 28(1): 143-146
89. Lester KS. (1969) The unusual nature of root formation in molar teeth of the laboratory rat. *J Ultrast Res* 28 : 481-506

90. Lianjia Y, Yuhao G, White FH. (1993) Bovine bone morphogenetic protein-induced dentinogenesis. *Clin Orthop* 295 :305-312
91. Linde A, Goldberg M. (1993) Dentinogenesis. *Crit Rev Oral Biol Med* 4(5):679-728
92. Lindskog S, Blomlof L, Hammarström L. (1988) Evidence for a role of odontogenic epithelium in maintaining the periodontal space. *J Clin Periodontol* 15(6):371-373
93. Lindskog S, Hammarström L. (1982) Formation of intermediate cementum. III: 3H-tryptophan and 3H-proline uptake into the epithelial root sheath of Hertwig in vitro. *J Craniofac Genet Dev Biol* 2(2) : 171-177
94. Lindskog S. (1982a) Formation of intermediate cementum. I: early mineralization of aprismatic enamel and intermediate cementum in monkey. *J Craniofac Genet Dev Biol* 2(2) : 147-160
95. Lindskog S. (1982b) Formation of intermediate cementum. II: a scanning electron microscopic study of the epithelial root sheath of Hertwig in monkey. *J Craniofac Genet Dev Biol* 2(2) : 161-169
96. Listgarten MA, Kamin A. (1969) The development of a cementum layer over the enamel surface of rabbit molars--a light and electron microscopic study. *Arch Oral Biol* 14(8):961-985

97. Listgarten MA, Rosenberg MM. (1979) Histological study of repair following new attachment procedures in human periodontal lesions. *J Periodontol* 50(7):333-344
98. Listgarten MA. (1972) Electron microscopic study of the junction between surgically denuded root surfaces and regenerated periodontal tissues. *J Periodontal Res* 7(1):68-90
99. Loe H, Waerhaug J. (1961) Experimental replantation of teeth in dogs and monkeys. *Arch Oral Biol* 3: 176-184
100. Luo W, Slavkin HC, Snead ML. (1991) Cells from Hertwig's epithelial root sheath do not transcribe amelogenin. *J Periodontal Res* 26(1): 42-47
101. Maas R, Bei M. (1997) The genetic control of early tooth development. *Crit Rev Oral Biol Med*;8(1):4-39
102. MacNeil RL, Berry J, D'Errico J, Strayhorn C, Somerman MJ. (1995) Localization and expression of osteopontin in mineralized and nonmineralized tissues of the periodontium. *Ann N Y Acad Sci* 21; 760 : 166-176
103. MacNeil RL, Sheng N, Strayhorn C, Fisher LW, Somerman MJ (1994) Bone sialoprotein is localized to the root surface during cementogenesis. *J Bone Miner Res* 9 :1597-1606

104. MacNeil RL, Thomas HF (1993) Development of the murine periodontium. II. Role of the epithelial root sheath in formation of the periodontal attachment. *J Periodontol* 64:285-291
105. Magloire H, Bouvier M, Joffre A. (1992) Odontoblast response under carious lesions. *Proc Finn Dent Soc* 88 Suppl 1:257-274
106. Magloire H, Joffre A, Bleicher F. (1996) An in vitro model of human dental pulp repair. *J Dent Res* 75(12):1971-8
107. Malassez L. (1885) Sur l'existence d'amas épithéliaux autour de la racine des dents chez l'homme adulte et à l'état normal (débris épithéliaux paradentaires) *Arch Physicol* (Paris) 5 : 129-148
108. Massa LF et Arana-Chavez VE. (2000) Ultrastructural preservation of rat embryonic dental tissues after rapid fixation and dehydration under microwave irradiation. *Eur J Oral Sci* 108:74-77
109. McCulloch CA. (1993) Basic considerations in periodontal wound healing to achieve regeneration. *Periodontol* 2000 1:16-25
110. McKay GS. (1976) The histology and microbiology of acute occlusal dentine lesions in human permanent molar teeth. *Arch Oral Biol* 21(1):51-58
111. McKee MD, Zalzal S, Nanci A. (1996) Extracellular matrix in tooth cementum and mantle dentin: localization of osteopontin and other

- noncollagenous proteins, plasma proteins, and glycoconjugates by electron microscopy. *Anat Rec* 245(2): 293-312
112. Melin M, Joffre-Romeas A, Farges JC, Couble ML, Magloire H, Bleicher F. (2000) Effects of TGFbeta1 on dental pulp cells in cultured human tooth slices. *J Dent Res* 79(9):1689-1696
113. Mjor IA, Dahl E, Cox CF. (1991) Healing of pulp exposures: an ultrastructural study. *J Oral Pathol Med* 20(10):496-501
114. Mjor IA. (1985) Dentin-predentin complex and its permeability: pathology and treatment overview. *J Dent Res* 64 Spec No:621-627
115. Nakamura M, Bringas P Jr, Nanci A, Zeichner-David M, Ashdown B, Slavkin HC. (1994) Translocation of enamel proteins from inner enamel epithelia to odontoblasts during mouse tooth development. *Anat Rec* 238(3):383-396
116. Nakamura M, Bringas PJ, Slavkin HC (1991) Inner enamel epithelia synthesize and secrete enamel proteins during mouse molar occlusal "enamel-free area" development. *J Craniofac Genet Dev Biol* 11:96-104
117. Nakamura Y, Gestrelus S, Hammarström L, Matsumoto K, Lundberg E, Ekdahl H, Lyngstadaas SP. (2001) Enamel matrix derivative induces reparative dentin formation *J Dent Res* 80: 652 (abstract 1002)

118. Nakashima M. (1990) The induction of reparative dentine in the amputated dental pulp of the dog by bone morphogenetic protein. *Arch Oral Biol* 35(7):493-497
119. Nakashima M. (1994) Induction of dentin formation on canine amputated pulp by recombinant human bone morphogenetic proteins (BMP)-2 and -4. *J Dent Res.* 73(9):1515-22.
120. Nanci A, Fortin M, Zalzal S. (1999) Antibodies to noncollagenous matrix proteins of calcified tissues bind to dental plaque bacteria *J Dent Res* 78: 421 (abstract 2522)
121. Nanci A, Hashimoto J, Zalzal S, Smith CE (1996a) Transient accumulation of proteins at interrod and rod enamel growth sites. *Adv Dent Res* 10:135-149
122. Nanci A, McKee MD, Smith CE. (1992) Immunolocalization of enamel proteins during amelogenesis in the cat. *Anat Rec* 233(3):335-349
123. Nanci A, Zalzal S, Gotoh Y, McKee MD (1996b) Ultrastructural characterization and immunolocalization of osteopontin in rat calvarial osteoblast primary cultures. *Microsc Res Tech* 33:214-231
124. Nanci A, Zalzal S, Lavoie P, Kunikata M, Chen W-Y, Krebsbach PH, Yamada Y, Hammarström L, Simmer JP, Fincham AG, Snead ML, Smith CE (1998) Comparative immunochemical analyses of the

- developmental expression and distribution of ameloblastin and amelogenin in rat incisors. *J Histochem Cytochem* 46:911-934
125. Nanci A. (1999) Content and distribution of noncollagenous matrix proteins in bone and cementum: relationship to speed of formation and collagen packing density. *J Struct Biol* 30;126(3):256-269
126. Nanci A. et Smith C.E. (1992) Development and calcification of enamel. In *Calcification in Biological Systems* (Ed. E. Bonucci). CRC Press, Boca Raton, pp. 313-343
127. Nanci A. et Smith C.E. (2000) Matrix-mediated mineralization in enamel and the collagen-based hard tissues. In: *Chemistry and Biology of Mineralized Tissues* (eds: Goldberg M., Boskey A., Robinson C.), Rosemont: American Academy of Orthopaedic Surgeons, 217-224
128. Nebgen DR, Inoue H, Sabsay B, Wei K, Ho CS, Veis A. (1999) Identification of the chondrogenic-inducing activity from bovine dentin (bCIA) as a low-molecular-mass amelogenin polypeptide. *J Dent Res* 78(9):1484-1494
129. Nishioka M, Shiiya T, Ueno K, Suda H. (1998) Tooth replantation in germ-free and conventional rats. *Endod Dent Traumatol* 14(4):163-73
130. Nyman S, Lindhe J, Karring T, Rylander H (1982) New attachment following surgical treatment of human periodontal disease *J Clin Periodontol* 9(4):290-296.



131. Owens PDA. (1978) Ultrastructure of Hertwig's epithelial root sheath during early root development in premolar teeth in dogs. *Arch Oral Biol* 23(2): 91-104
132. Owens PDA. (1980) A light and electron microscopic study of the early stages of root surface formation in molar teeth in the rat. *Arch Oral Biol* 24: 901-907
133. Paynter KJ, Pudy G. (1958) A study of the structure, chemical nature and development of cementum in the rat. *Anat Rec* 131: 233-251
134. Pereira JC, Segala AD, Costa CAS (2000) Human pulpal response to direct pulp capping with an adhesive system, *Am J Dent* 13:139-147
135. Pitaru S, McCulloch CA, Narayanan SA. (1994) Cellular origins and differentiation control mechanisms during periodontal development and wound healing. *J Periodontal Res* 29(2):81-94
136. Reitan K (1961) Behavior of Malassez's epithelial rests during orthodontic tooth movement. *Acta Odont Scand* 19:443-468
137. Robey PG (1996) Bone matrix proteoglycans and glycoproteins. In : *Principles of Bone Biology* (Eds : Bilezikian JP; Raisz LG; Rodan GA). Academic Press, pp.155-166
138. Robinson C, Kirkham J, Brookes SJ, Bonass WA, Shore RC. (1995) The chemistry of enamel development. *Int J Dev Biol* 39:145-152

139. Ruch JV. (1985) Odontoblast differentiation and the formation of the odontoblast layer. *J Dent Res* 64 (Sp):489-98
140. Rutherford RB, Wahle J, Tucker M, Rueger D, Charette M. (1993) Induction of reparative dentine formation in monkeys by recombinant human osteogenic protein-1 *Arch Oral Biol* 38(7):571-6
141. Sawada T, Nanci A. (1995) Spatial distribution of enamel proteins and fibronectin at early stages of rat incisor tooth formation. *Arch Oral Biol* 40(11):1029-1038
142. Schroder U. (1985) Effects of calcium hydroxide-containing pulp-capping agents on pulp cell migration, proliferation, and differentiation. *J Dent Res* 64 Spec No:541-548
143. Schroeder H.E. (1986) The periodontium. Handbook of Microscopic Anatomy. Vol. V/5. Springer, Berlin pp.23-129
144. Schroeder HE et Listgarten MA (1977) Fine structure of the developing epithelial attachment of human teeth. In : *monographs in developmental Biology*. (Ed :Wolsky A) Karger, Basel, Switzerland pp.1-146
145. Selvig KA. (1964) An ultrastructural study of cementum formation. *Acta Odont Scand* 22 : 105-120
146. Slavkin HC, Bessem C, Fincham AG, Bringas P Jr, Santos V, Snead ML, Zeichner-David M. (1989a) Human and mouse cementum proteins

- immunologically related to enamel proteins. *Biochim Biophys Acta* 25:991(1):12-18
147. Slavkin HC, Boyde A. (1974) Cementum: An epithelial secretory product? *J Dent Res* 53: 157 (abstract 409)
148. Slavkin HC, Bringas P Jr, Bessem C, Santos V, Nakamura M, Hsu MY, Snead ML, Zeichner-David M, Fincham AG. (1989b) Hertwig's epithelial root sheath differentiation and initial cementum and bone formation during long-term organ culture of mouse mandibular first molars using serumless, chemically-defined medium. *J Periodontal Res* 24(1) : 28-40
149. Slavkin HC. (1976) Towards a cellular and molecular understanding of periodontics. Cementogenesis revisited. *J Periodontol* 47(5):249-255
150. Smith AJ, Tobias RS, Cassidy N, Plant CG, Browne RM, Bègue-Kim C, Ruch JV, Lesot H. (1994) Odontoblast stimulation in ferrets by dentine matrix components. *Arch Oral Biol* 39(1):13-22
151. Smith AJ, Tobias RS, Plant CG, Browne RM, Lesot H, Ruch JV (1990) In vivo morphogenetic activity of dentine matrix proteins. *J Biol Buccale* 18(2):123-129
152. Smith CE, Nanci A. (1996) Dynamics of amelogenesis. *Anat Rec* 245:219-234

153. Smith CE., Chen W-Y., Issid M, Fazel A. (1995) Enamel matrix protein turnover during amelogenesis: basic biochemical properties of short-lived sulfated enamel proteins. *Calcif Tissue Int* 57:133-144
154. Sodek J, Ganss B, McKee MD. (2000) Osteopontin. *Crit Rev Oral Biol Med* 11(3):279-303
155. Somerman MJ, Berry JE, Ouyang HJ, Strayhorn CL, McCauley LK, Saygin NE, Barald K, D'Errico JA (2000) Defining the cementoblast: in situ to in vitro. In: *Chemistry and Biology of Mineralized Tissues* (eds: Goldberg M, Boskey A, Robinson C), Rosemont: American Academy of Orthopaedic Surgeons, 311-316
156. Sommer B, Bickel M, Hofstetter W, Wetterwald A (1996) Expression of matrix proteins during the development of mineralized tissues. *Bone* 19:371-380
157. Spahr A, Slaby I, Hammarström L, Lyngstadaas S.P. (2001) Amelin expression during reparative dentin formation *J Dent Res* 80: 652 (abstract 1004)
158. Spouge JD. (1980) A new look at the rests of Malassez. A review of their embryological origin, anatomy, and possible role in periodontal health and disease. *J Periodontol* 51(8):437-444
159. Tagger M, Massler M. (1975) Periapical tissue reactions after pulp exposure in rat molars. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 39(2):304-17

160. Ten Cate A.R. (1998) Oral histology: Development, structure and function, 5<sup>ième</sup> ed, Mosby, St-Louis.
161. Ten Cate AR (1975) Formation of supporting bone in association with periodontal ligament organization in the mouse. *Arch Oral biol* 20: 137-138
162. Ten Cate AR (1996) The role of epithelium in the development, structure and function of the tissues of tooth support. *Oral Dis* 2(1) : 55-62
163. Ten Cate AR. (1978) A fine structural study of coronal and root dentinogenesis in the mouse: observations on the so-called 'von Korff fibres' and their contribution to mantle dentine. *J Anat* 125(1) : 183-197
164. Tenorio D, Cruchley A, Hughes FJ. (1993) Immunocytochemical investigation of the rat cementoblast phenotype. *J Periodont Res* 28 :411-419
165. Thesleff I, Vaahtokari A, Vainio S, Jowett A. (1996) Molecular mechanisms of cell and tissue interactions during early tooth development. *Anat Rec* 245(2):151-161
166. Thomas HF, Kollar EJ (1988) Tissue interactions in normal murine root development. In Davidovitch Z, ed. *The Biological Mechanisms of Tooth Eruption and Root Resorption*. Birmingham, EB-SCO Media, 145-151

167. Thomas HF, Kollar EJ. (1989) Differentiation of odontoblasts in grafted recombinations of murine epithelial root sheath and dental mesenchyme. *Arch Oral Biol* 34 :27-35
168. Thomas HF. (1995) Root formation. *Int J Dev Biol* 39(1):231-237
169. Tokiyasu Y, Takata T, Saygin E, Somerman M. (2000) Enamel factors regulate expression of genes associated with cementoblasts. *J Periodontol* 71(12):1829-1839
170. Torneck CD, Wagner D. (1980) The effect of a calcium hydroxide cavity liner on early cell division in the pulp subsequent to cavity preparation and restoration. *J Endod* 6(9):719-23
171. Tsuji T, Takei K, Inoue T, Shimono M, Yamamura T. (1987) An experimental study on wound healing of surgically exposed dental pulps in germ-free rats. *Bull Tokyo Dent Coll* 28(1):35-38
172. Tziafas D, Kolokuris I, Alvanou A, Kaidoglou K. (1992) Short-term dentinogenic response of dog dental pulp tissue after its induction by demineralized or native dentine, or predentine. *Arch Oral Biol* 37(2):119-28
173. Tziafas D. (1995) Basic mechanisms of cytodifferentiation and dentinogenesis during dental pulp repair. *Int J Dev Biol* 39(1):281-290
174. Valderhaug JP, Nylen MU. (1966) Function of epithelial rests as suggested by their ultrastructure. *J Periodontal Res* 1:69-78

175. Veis A, Sabsay B. (1987) The collagen of mineralized matrices. In W.A. Peck, ed. *Bone and Mineral Research, Annual 5: A Yearly Survey of Developments in the Field of Bone and Mineral Metabolism*. Elsevier, Amsterdam. pp. 1-63.
176. Veis A, Tompkins K, Alvares K, Wei K, Wang L, Wang XS, Brownell AG, Jengh SM, Healy KE. (2000) Specific amelogenin gene splice products have signaling effects on cells in culture and in implants in vivo. *J Biol Chem*. 275(52):41263-41272.
177. Veis A. (1985) The role of dental pulp--thoughts on the session on pulp repair processes. *J Dent Res* 64 Spec No:552-4
178. Viebahn C. (1995) Epithelio-mesenchymal transformation during formation of the mesoderm in the mammalian embryo. *Acta Anat (Basel)* 154(1):79-97
179. Warshawsky H et Moore G. (1967) A technique for the fixation and decalcification of rat incisors for electron microscopy. *J Histochem Cytochem* 15:542-549
180. Wentz FM, Weinman JP, Schour I. (1950) The prevalence, distribution, and morphologic changes of the epithelial remnants in the molar region of the rat. *J Dent Res* 29:637-646

181. Wesselink PR, Beertsen W. (1993) The prevalence and distribution of rests of Malassez in the mouse molar and their possible role in repair and maintenance of the periodontal ligament. *Arch Oral Biol* 38: 399-403
182. Wu Y, Denhardt DT, Rittling SR. (2000) Osteopontin is required for full expression of the transformed phenotype by the ras oncogene. *Br J Cancer* 83(2):156-163
183. Yamamoto T, Domon T, Takahashi S, Wakita M (1994) Comparative study of the initial genesis of acellular and cellular cementum in rat molars. *Anat Embryol* 190 (6) : 521-527
184. Yamamoto T, Wakita M. (1990) Initial attachment of principal fibers to the root dentin surface in rat molars. *J Periodontal Res* 25(2): 113-9
185. Yamamoto T. (1986) The innermost layer of cementum in rat molars : Its ultrastructure, development and calcification. *Arch Histol Jpn* 49 : 459-481
186. Yamamura T, Shimono M, Koike H, Terao M, Tanaka Y, Sakai Y, Inoue T, Yoshiki S, Tachikawa T, Kawahara H, Watanabe O. (1980) Differentiation and induction of undifferentiated mesenchymal cells in tooth and periodontal tissue during wound healing and regeneration. *Bull Tokyo Dent Coll* 21(3):181-221



187. Yamamura T. (1985) Differentiation of pulpal cells and inductive influences of various matrices with reference to pulpal wound healing. *J Dent Res.* 64 :530-40.
188. Yamasaki M, Kumazawa M, Kohsaka T, Nakamura H, Kameyama Y. (1994) Pulpal and periapical tissue reactions after experimental pulpal exposure in rats. *J Endod* 20(1):13-17
189. Yokota M, Nagata T, Ishida H, Wakano Y. (1992) Clonal dental pulp cells (RDP4-1, RPC-C2A) synthesize and secrete osteopontin (SPP1, 2ar). *Biochem Biophys Res Commun* 15;189(2):892-898
190. Yoshida K, Yoshida N., Iwaku M. (2002) Expression of non-collagenous proteins and TGF- $\beta$ s during reparative dentinogenesis. *J Dent Res* 81: 155 (abstract 1086)
191. Yu SM, Stashenko P (1987) Identification of inflammatory cells in developing rat periapical lesions. *J Endod* 13(11):535-40
192. Zeichner-David M. (2001) Is there more to enamel matrix proteins than biomineralization? *Matrix Biol* 20(5-6):307-316
193. Zetterstrom O, Andersson C, Eriksson L, Fredriksson A, Friskopp J, Heden G, Jansson B, Lundgren T, Nilveus R, Olsson A, Renvert S, Salonen L, Sjostrom L, Winell A, Ostgren A, Gestrelus S. (1997) Clinical safety of enamel matrix derivative (EMDOGAIN) in the treatment of periodontal defects. *J Clin Periodontol* 24(9 Pt 2):697-704

194. Zhang Q, Fan M, Bian Z, Chen Z, Zhu Q. (2000) Immunohistochemistry of bone sialoprotein and osteopontin during reparative dentinogenesis in vivo. *Chin J Dent Res* 3(2):38-43