

# Développement et utilisation d'un bioréacteur reproduisant in vitro l'environnement biologique d'une dent dévitalisée pour l'évaluation de biomatériaux innovants destinés à l'endodontie régénératrice selon une stratégie dite « cell-homing »

Aurélien LOUVRIER<sup>1,2</sup>, Marie KROEMER<sup>2,3</sup>, Marion TISSOT<sup>2</sup>, Julie VARNIER<sup>2</sup>, Enora DANGLES<sup>2</sup>, Lisa TERRANOVA<sup>4</sup>, Florent MEYER<sup>4</sup>, Edouard EUVRARD<sup>1,5</sup>, Gwenaël ROLIN<sup>2,6</sup> and Christophe MEYER<sup>1,5</sup>

1: Service de chirurgie maxillo-faciale, CHU Besançon, F-25000 Besançon, France.

2: INSERM, EFS BFC, UMR1098, Interactions hôte-greffon-tumeur - Ingénierie cellulaire et génique, Université de Bourgogne Franche-Comté, Besançon, France.

3: Pharmacie centrale, CHU Besançon, F-25000 Besançon, France.

4: INSERM, UMR-S11.21, Biomatériaux et bioingénierie, Université de Strasbourg, Strasbourg, France.

5: Nanomedicine Lab, Imagery and Therapeutics, EA 4662, Medical Faculty, Université de Bourgogne Franche-Comté, Besançon, France.

6: Inserm CIC 1431, CHU Besançon, F-25000 Besançon, France.

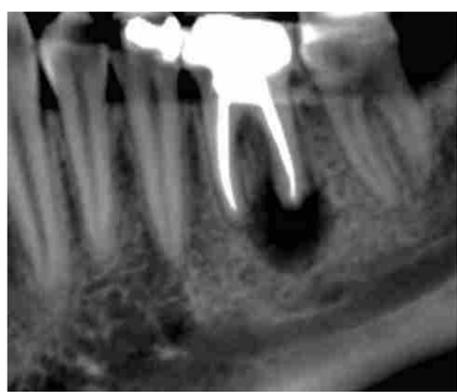


## Introduction

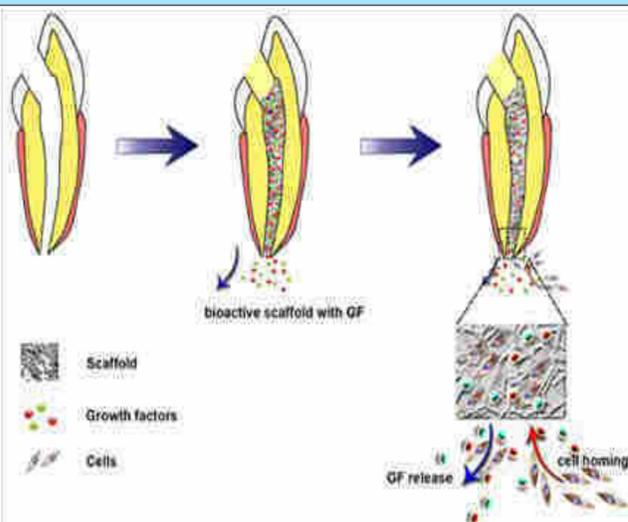
La procédure endodontique de routine (Fig. 1) consiste à remplacer la pulpe dentaire par un matériau inerte (Gutta Percha). Ce traitement a un taux d'échec de 10% (7 millions de procédures par an en France) [1,2] et peut conduire au développement de lésions péri-apicales (Fig.2) et/ou à la perte de la dent. De nouvelles méthodes alternatives de traitement sont donc nécessaires pour régénérer et restaurer une pulpe dentaire fonctionnelle à partir de cellules souches mésenchymateuses dentaires résiduelles après une procédure endodontique selon une approche " cell-homing ".



**Figure 1 : Traitement endodontique.** Ablation de la pulpe dentaire et son remplacement par un matériau inerte (gutta percha) [3].



**Figure 2 :** Vue sagittale d'un scanner mandibulaire montrant une lésion périapicale développée après l'échec d'un traitement endodontique classique.



**Figure 3 :** Endodontie régénérative avec une approche " cell-homing " [4].

## Objectifs

- 1 Conception, construction et utilisation d'un bioréacteur sur mesure pour réaliser un modèle biomimétique
- 2 Développement d'un modèle de réservoir de cellules souches imitant la papille apicale dentaire
- 3 Évaluation d'un biomatériau conique innovant (PCL /PLA + AT)\* pour la régénération de la pulpe dentaire avec des DPSCs dans notre bioréacteur.

\* polycaprolactone / polylactide acid + tannic acid

# Développement et utilisation d'un bioréacteur reproduisant in vitro l'environnement biologique d'une dent dévitalisée pour l'évaluation de biomatériaux innovants destinés à l'endodontie régénératrice selon une stratégie dite « cell-homing »

Aurélien LOUVRIER<sup>1,2</sup>, Marie KROEMER<sup>2,3</sup>, Marion TISSOT<sup>2</sup>, Julie VARNIER<sup>2</sup>, Enora DANGLES<sup>2</sup>, Lisa TERRANOVA<sup>4</sup>, Florent MEYER<sup>4</sup>, Edouard EUVRARD<sup>1,5</sup>, Gwenaël ROLIN<sup>2,6</sup> and Christophe MEYER<sup>1,5</sup>

1: Service de chirurgie maxillo-faciale, CHU Besançon, F-25000 Besançon, France.

2: INSERM, EFS BFC, UMR1098, Interactions hôte-greffon-tumeur - Ingénierie cellulaire et génique, Université de Bourgogne Franche-Comté, Besançon, France.

3: Pharmacie centrale, CHU Besançon, F-25000 Besançon, France.

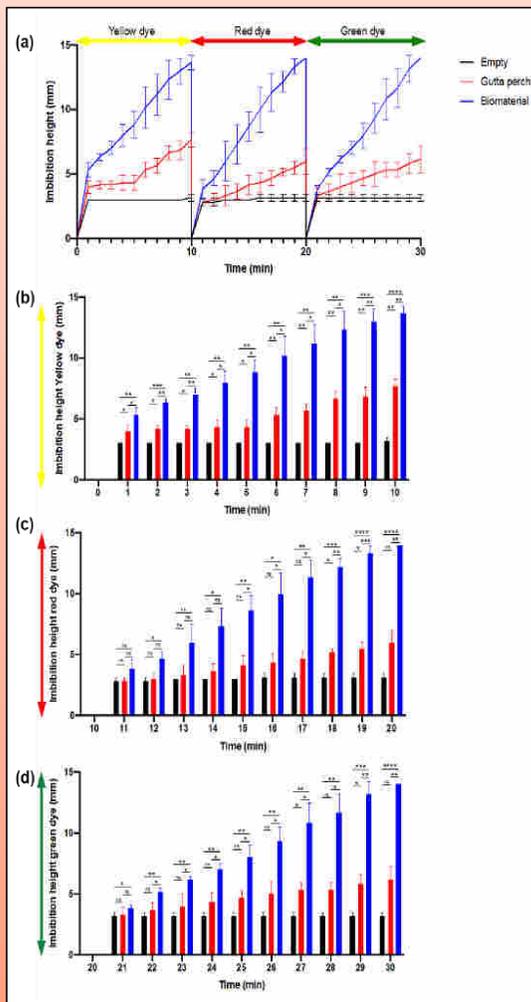
4: INSERM, UMR-S11.21, Biomatériaux et bioingénierie, Université de Strasbourg, Strasbourg, France.

5: Nanomedicine Lab, Imagery and Therapeutics, EA 4662, Medical Faculty, Université de Bourgogne Franche-Comté, Besançon, France.

6: Inserm CIC 1431, CHU Besançon, F-25000 Besançon, France.



## 1 Bioréacteur biomimétique d'une racine dentaire après une procédure endodontique



**Figure 5 : Test d'imbibition du biomatériau dans le bioréacteur avec un liquide successivement de couleur jaune, rouge et verte :** ligne noire/histogramme = bioréacteur vide (condition de contrôle) - ligne rouge/histogramme = Gutta percha (condition de contrôle) - ligne bleue/histogramme = biomatériau. a = vue globale de la hauteur de la coloration dans toutes les conditions, b = hauteur de la coloration avec de l'eau de couleur jaune, c = hauteur de la coloration avec de l'eau de couleur rouge, d = hauteur de la coloration avec de l'eau de couleur verte. ns = no significant, \* =  $p < 0.05$ , \*\* =  $p < 0.01$ , \*\*\* =  $p < 0.001$ , \*\*\*\* =  $p < 0.0001$

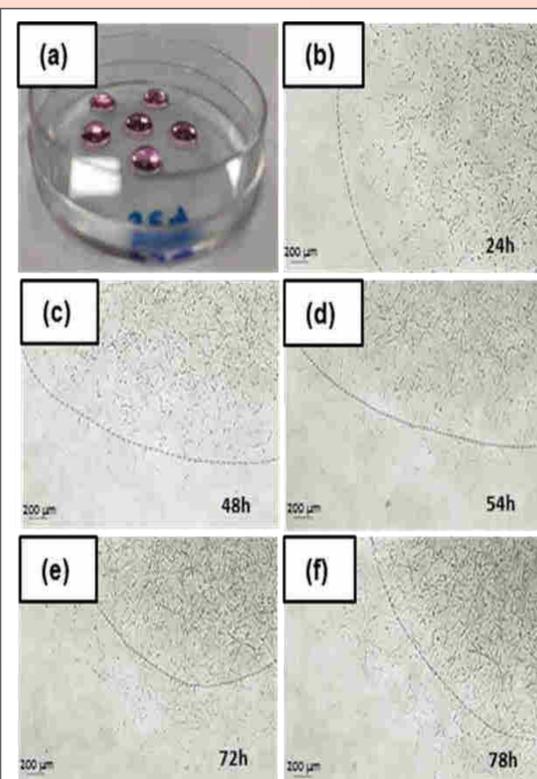
Le bioréacteur (Fig.4), composé d'un flacon permettant les échanges gazeux, d'un système fluide piloté par une pompe péristaltique et de la chambre de culture imprimée en 3D reproduisant le canal dentaire après un traitement endodontique est fonctionnel avec une imbibition complète du biomatériau (Fig.5).



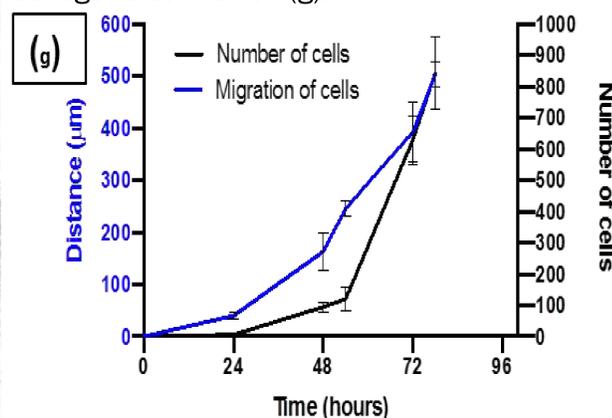
**Figure 4 : Le système fluide du bioréacteur biomimétique** composé d'une pompe péristaltique, d'un flacon permettant les échanges gazeux et du bioréacteur transparent imprimé en 3D. Jaune = bouchon, Orange = biomatériau conique, Rose = DPSCs dans un gel collagénique (réservoir cellulaire), Violet = circulation du milieu de culture

2

## Développement du modèle de réservoir de cellules souches



**Figure 6 : Demi-sphères de 25 µl de gel de collagène cellularisé à  $4.5 \times 10^6$  cells / ml dans une boîte de petri (a).** Observation des cultures à 24, 48, 54, 72 et 78 h (respectivement b, c, d, e et f) au microscope optique. Barre = 200 µm. Evolution temporelle (de 0 à 78 h) du nombre de cellules et de la distance de migration des cellules en dehors de la demi-sphère de collagène cellularisé (g).



Afin de reproduire l'environnement cellulaire apical après un traitement endodontique [5], un modèle de réservoir cellulaire a été développé sous la forme d'un gel de collagène cellularisé (DPSCs) (Fig.6). De cette façon, l'introduction des cellules dans le bioréacteur peut être précise et les cellules peuvent également être capables de sortir de ce gel de collagène par des phénomènes biologiques comme la prolifération et la migration.

# Développement et utilisation d'un bioréacteur reproduisant in vitro l'environnement biologique d'une dent dévitalisée pour l'évaluation de biomatériaux innovants destinés à l'endodontie régénératrice selon une stratégie dite « cell-homing »

Aurélien LOUVRIER<sup>1,2</sup>, Marie KROEMER<sup>2,3</sup>, Marion TISSOT<sup>2</sup>, Julie VARNIER<sup>2</sup>, Enora DANGLES<sup>2</sup>, Lisa TERRANOVA<sup>4</sup>, Florent MEYER<sup>4</sup>, Edouard EUVRARD<sup>1,5</sup>, Gwenaël ROLIN<sup>2,6</sup> and Christophe MEYER<sup>1,5</sup>

1: Service de chirurgie maxillo-faciale, CHU Besançon, F-25000 Besançon, France.

2: INSERM, EFS BFC, UMR1098, Interactions hôte-greffon-tumeur - Ingénierie cellulaire et génique, Université de Bourgogne Franche-Comté, Besançon, France.

3: Pharmacie centrale, CHU Besançon, F-25000 Besançon, France.

4: INSERM, UMR-S11.21, Biomatériaux et bioingénierie, Université de Strasbourg, Strasbourg, France.

5: Nanomedicine Lab, Imagery and Therapeutics, EA 4662, Medical Faculty, Université de Bourgogne Franche-Comté, Besançon, France.

6: Inserm CIC 1431, CHU Besançon, F-25000 Besançon, France.



3

## Évaluation d'un biomatériau innovant (PCL/PLA + AT) dans un modèle de bioréacteur

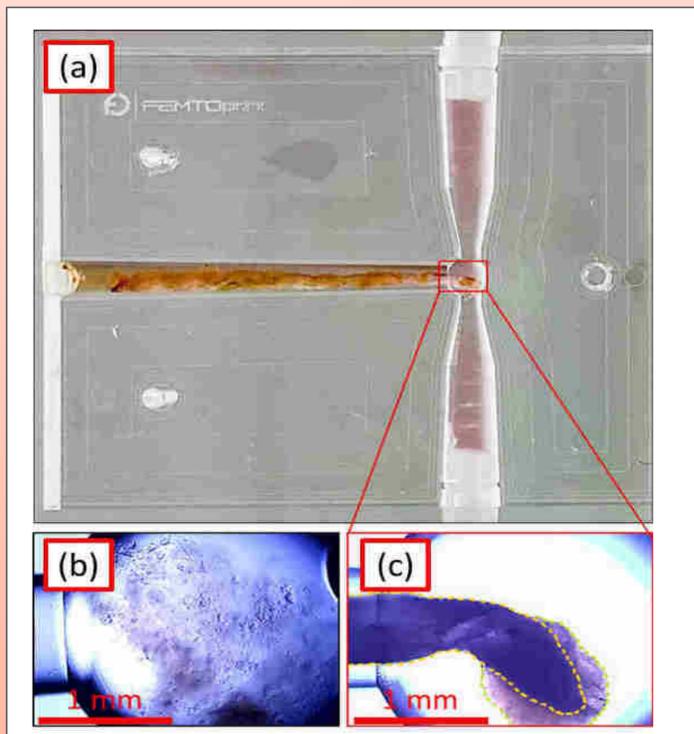


Figure 7 : Vue macroscopique du bioréacteur avec un cône PLA/PCL+AT en place (a). Observations microscopiques de la "région péri-apicale" du bioréacteur avec cellules/sans biomatériau conique (b) et avec cellules/sans biomatériau conique après 3 jours de culture (c), la ligne pointillée orange indique le contour du cône, la ligne pointillée verte indique le contour du gel de collagène cellularisé.

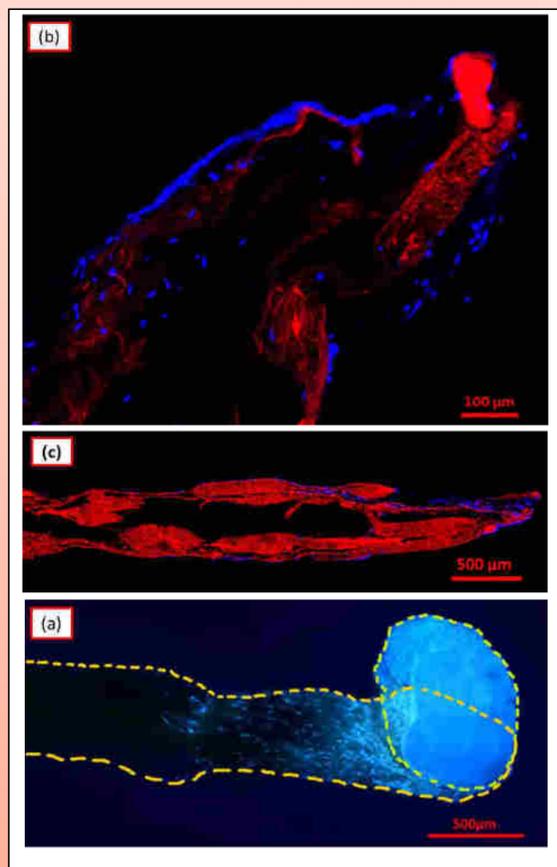


Figure 8 : Analyse histologique d'un cône de PLA/PCL+TA cultivé dans un bioréacteur biomimétique avec système fluide et colonisé par des DPSCs. Après 3 semaines de culture : Observation au microscope inversé à lumière fluorescente d'un cône non sectionné (a) : les noyaux cellulaires sont colorés en bleu par le DAPI, la ligne pointillée orange indique le contour du cône, la ligne pointillée verte indique le contour du gel de collagène cellularisé. Observation au microscope confocal de la région apicale (b) et d'une vue large (c) d'une section longitudinale d'un cône : les noyaux cellulaires sont colorés en bleu par le DAPI et le cône est coloré en rouge par le rouge de Nile.

L'ensemencement des cellules dans le bioréacteur (Fig.7a) peut être réalisé avec précision (Fig.7b) et est suivi d'un phénomène d'agrégation des cellules autour du biomatériau après insertion (Fig.7.c). Après 3 semaines de culture dans le bioréacteur avec fluide, les DPSCs sont capables d'adhérer, de coloniser et de migrer au sein du biomatériau (Fig.8).

## Conclusion

Ce nouveau modèle expérimental biomimétique n'est pas destiné à remplacer d'autres modèles expérimentaux, mais à optimiser le développement ou la sélection de biomatériaux avant leur utilisation chez l'animal. Les principaux avantages de ce bioréacteur biomimétique transparent, facile à utiliser, sont de reproduire la cavité d'un canal dentaire dévitalisé et alésé, de permettre l'ensemencement cellulaire uniquement à l'extrémité apicale et d'être équipé d'un système fluide permettant de "mimer" un apport vasculaire apical résiduel (distribution apicale du milieu de culture). Il s'agit d'un modèle expérimental simple et complémentaire permettant d'optimiser l'exploration in vitro de biomatériaux candidats à la régénération de la pulpe dentaire humaine selon une méthode "cell-homing".