



Investigation de l'effet du peptide antimicrobien KSL-W sur les cellules souches de la pulpe dentaire : Une perspective de traitement endodontique

Mémoire

Bilal Damlaj

Maîtrise en sciences dentaires - avec mémoire
Maître ès sciences (M. Sc.)

Québec, Canada

© Bilal Damlaj, 2020

**Investigation de l'effet du peptide
antimicrobien KSL-W sur les cellules souches
de la pulpe dentaire : Une perspective de
traitement endodontique.**

Mémoire

Bilal Damlaj

Sous la direction de :

Mahmoud Rouabhia, directeur de recherche

Résumé

En endodontie, les peptides antimicrobiens (AMP) pourraient résoudre les limitations potentielles liées à l'utilisation d'antibiotiques. L'objectif de cette étude était d'évaluer l'effet du KSL-W sur l'adhésion, la prolifération et la migration des cellules souches de la pulpe dentaire (DPSC).

Méthodes : Les DPSC ont été cultivées en présence et en l'absence de KSL-W à différentes concentrations ou d'une combinaison de deux (ciprofloxacine et métronidazole ; DAP) ou trois (ciprofloxacine, métronidazole et minocycline ; TAP) antibiotiques. L'adhésion cellulaire a été évaluée à l'aide de coloration au cristal violet et d'observations microscopiques. La viabilité/l'activité métabolique (V/AM) des DPSC a été étudiée par un test MTT. L'effet de KSL-W sur la migration cellulaire / la guérison des blessures a été évaluée à l'aide du test de blessure de la culture dite "scratch test". Les données collectées ont été analysées par ANOVA. Une différence significative a été considérée à $P \leq 0.05$.

Résultats : Le KSL-W n'a pas d'effet inhibiteur sur l'adhésion des DPSC, comparativement au DAP et au TAP. Ces observations sont confirmées par nos analyses de viabilité/activité métaboliques (V/AM) des cellules. En effet, les résultats du MTT ont montré une V/AM plus adéquate en présence de KSL-W. À titre d'exemple, les cellules en présence de KSL-W à 10 et 50 $\mu\text{g/ml}$, montrent une V/AM comparable au contrôle (cellules non traitées). Il est important de noter que le KSL-W a favorisé la migration cellulaire après une blessure. Les DPSC ont pu migrer et recouvrir la blessure plus rapidement avec KSL-W qu'avec les antibiotiques. **Conclusion** : Comparativement aux antibiotiques, le KSL-W n'a pas d'effets négatifs sur l'adhésion et la V/AM. Ce peptide semble favoriser la migration cellulaire. Ces travaux suggèrent l'utilisation du KSL-W comme un agent antimicrobien pouvant être utilisé en endodontie.

Abstract

In endodontic treatment, antimicrobial peptides (AMP) could solve potential limitations associated with the use of antibiotics. The objective of this study was to evaluate the effect of KSL-W on human dental pulp stem cells (DPSC) adhesion, proliferation and migration.

Methods: *DPSCs were cultured in the presence and absence of KSL-W at various concentrations or double (ciprofloxacin and metronidazole; DAP) or triple (ciprofloxacin, metronidazole, and minocycline; TAP) antibiotics. Cell adhesion was investigated using crystal violet staining. The viability / metabolic activity (V/MA) of DPSC was evaluated with the culture injury test known by "scratch test". The effect of KSL-W on cell migration/wound healing was evaluated using an in vitro scratch assay. Collected data were analyzed by ANOVA. Significant difference was considered at $P \leq 0.05$.*

Results: *KSL-W doesn't have an inhibitory effect on DPSCs adhesion as opposed to DAP or TAP. These observations are confirmed by our analyzes of viability/ metabolic activity (V/MA) of cells. Indeed, the MTT results showed a more adequate V/MA in the presence of KSL-W. For example, cells in the presence of KSL-W at 10 and 50 $\mu\text{g/ml}$ show a V/MA comparable to the control (untreated cells). It is important to note that KSL-W promoted cell migration after injury. DPSC were able to migrate and cover the wound faster with KSL-W than with antibiotics.*

Conclusion: *Compared to antibiotics, KSL-W has no negative effects on adhesion and V/MA. This peptide appears to promote cell migration. This work suggests the use of KSL-W as an antimicrobial agent that can be used in endodontics.*

Table des matières

Résumé.....	<i>iii</i>
Abstract.....	<i>iv</i>
Liste des figures.....	<i>vii</i>
Liste des abréviations.....	<i>viii</i>
Dédicace.....	<i>ix</i>
Remerciements.....	<i>x</i>
Introduction.....	1
1. Revue de la littérature.....	3
1.1 Structures de la dent.....	3
1.1.1 Émail.....	4
1.1.2 Dentine.....	4
1.1.3 Cément.....	5
1.1.4 Pulpe.....	6
1.2 Tissus de support de la dent.....	7
1.2.1 Ligament parodontal.....	8
1.2.2 Os alvéolaire.....	9
1.2.3 Muqueuse orale.....	9
1.3 Les pathologies dentaires.....	11
1.3.1 Maladie carieuse.....	11
1.3.2 La nécrose pulpaire.....	14
1.3.3 Les lésions périapicales.....	14
1.4 Les cellules souches.....	15
1.4.1 Cellules souches totipotentes/pluripotentes.....	15
1.4.2 Cellules souches dans l'environnement oral.....	16
1.4.3 Différenciation des cellules souches pulpaire et apicales.....	17
1.4.4 Utilité des cellules souches dans le domaine médicale.....	18
1.4.4.1 Utilité des cellules souches en médecine.....	18
1.4.4.2 Utilité en endodontie.....	19
1.5 Les agents endodontiques antimicrobiens.....	20
1.5.1 Mélange des antibiotiques locaux.....	20
1.5.1.1 Mode d'action.....	21
1.5.1.2 Utilité en endodontie.....	21
1.5.1.3 Effets secondaires.....	22
1.5.2 L'hydroxyde de calcium.....	22
1.5.2.1 Propriétés de l'hydroxyde de calcium.....	22
1.5.2.2 Utilisation de l'hydroxyde de calcium en endodontie.....	23
1.5.2.3 Effets secondaires.....	23

1.6 Les traitements endodontiques	25
1.6.1 La revascularisation	26
1.6.2 La régénération des tissus de la pulpe.....	28
1.7 Les peptides antimicrobiens	29
1.7.1 Introduction.....	29
1.7.2 Historique	29
1.7.3 Activité (rôle) des PAMs	30
1.7.4 Classification	30
1.7.5 Structure et mode d'action des PAMs	31
1.7.6 Expression et régulation des PAMs	34
1.7.7 Les histatines salivaires	35
1.7.8 Résistance bactérienne aux PAMs	35
1.7.9 Développement de médicaments à base de peptides antimicrobiens ...	36
1.7.10 Le peptide KSL-W	37
1.7.11 Perspectives d'un agent endodontique	38
1.8 Mise en contexte	39
1.9 Objectifs de recherche	40
1.9.1 Hypothèse	40
1.9.2 Objectifs	40
1.9.3 Pertinence du projet	40
2 Démarche de recherche proposée	42
2.1 Origine des cellules souches pulpaire s	42
2.2 Description de l'antibiothérapie locale	42
2.3 Description du KSL-W	42
2.4 Évaluation des effets du KSL-W et des antibiotiques sur l'adhésion des cellules souches pulpaire s	43
2.5 Évaluation de l'effet des antibiotiques et du KSL-W sur la viabilité/l'activité métabolique des cellules souches pulpaire s	44
2.6 Évaluation de l'effet des antibiotiques et du KSL-W sur la migration des cellules souches pulpaire s en cas de blessure	45
2.7 Analyses statistiques	47
3 Résultats	45
3.1 Comparaison de l'effet du double et du triple antibiotique avec celui du peptide KSL-W sur l'adhésion des cellules souches pulpaire s	45
3.2 Évaluation de la viabilité/activité métabolique des DPSC après 48h	49
3.3 Évaluation de l'effet des doubles et triples antibiotiques ou le KSL-W sur la migration des DPSC	50
4 Discussion	53
Conclusion	60

Liste des figures

Figure 1. Schéma des différentes structures de la dent	3
Figure 2. L'illustration montre l'environnement dans lequel les dents sont ancrées	8
Figure 3. L'effet de la maladie carieuse sur la dent et les structures qui la supportent.....	13
Figure 4. Illustration qui décrit les sources potentielles de cellules souches dans l'environnement buccal	17
Figure 5. Schéma qui montre les différentes étapes de la revascularisation	26
Figure 6. Schéma de la technique de revascularisation d'une molaire permanente immature avec une pulpe nécrotique	27
Figure 7. L'effet direct et indirect des peptides antimicrobiens (PAMs) sur les bactéries et l'hôte	31
Figure 8. Schéma expérimental pour évaluer les effets des antibiotiques et du KSL-W sur l'adhésion cellulaire.....	43
Figure 9. Schéma expérimental montrant les différentes étapes d'évaluation de l'effet des antibiotiques et du KSL-W sur la viabilité/activité métabolique (V/AM) des cellules.....	45
Figure 10. Analyse microscopique de l'effet du double antibiotique sur les DPSC	46
Figure 11. Analyse microscopique de l'effet du peptide KSL-W sur les cellules souches de la pulpe dentaire.....	47
Figure 12. Évaluation quantitative de l'effet des molécules (double et triple antibiotiques, KSL-W) sur l'adhésion des DPSC après 8 heures.....	48
Figure 13. Évaluation quantitative de l'effet des molécules (double et triple antibiotiques, KSL-W) sur l'adhésion des DPSC après 24 heures.....	48
Figure 14. Évaluation quantitative de l'effet des antibiotiques locaux (DAP ou TAP) et du peptide KSL-W sur le taux de prolifération des DPSC	49
Figure 15. Analyse microscopique de l'effet des antibiotiques locaux (double et triple) et du peptide KSL-W sur le taux de migration des cellules souches pulpaire.....	51
Figure 16. L'effet des molécules (doubles antibiotiques et peptide KSL-W) sur la migration des cellules souches pulpaire	52
Figure 17. L'effet des triples antibiotiques et du peptide antimicrobien KSL-W sur la migration des cellules souches pulpaire.....	52

Liste des abréviations

AAE	<i>American association of endodontists</i>
AMBN	Améloblastine
AMEL	Amélogénine
BMSCS	Cellules souches de la moelle osseuse
Ca(OH) ₂	Hydroxyde de calcium
DAP	Pâte du double antibiotique
DFSCS	Cellules souches de follicules dentaires
DPSC	Cellules souches de la pulpe dentaire
ENAM	Énaméline
GMSCS	Cellules souches mésenchymateuses d'origine gingivale
IFN γ	Interféron gamma
IL	Interleukine
IL-1 β	Interleukine 1 beta
IPAPCS	Cellules progénitrices périapicales inflammées
KSL-W	Peptide (KKVVFVWKFK-NH ₂)
MMPs	Métalloprotéinases matricielles
MTA	L'agrégat de trioxyde minéral
OESCS	Cellules souches épithéliales buccales
PAM	Peptide antimicrobien
PDLSCS	Cellules souches du ligament parodontal
PSCS	Cellules souches du périoste
SCAP	Cellules souches de la papille apicale
SHED	Cellules souches de dents de lait exfoliées
SGSCS	Cellules souches des glandes salivaires
TAP	Pâte du triple antibiotique
TGPCS	Cellules incluent les cellules progénitrices du germe dentaire

Dédicace

À ma conjointe Dana, mon fils Dany et à toute ma famille.

Remerciements

Je voudrais tout d'abord exprimer mes remerciements à mon directeur de recherche, le Dr Mahmoud Rouabhia, pour son appui, son aide, sa patience, sa disponibilité et ses conseils qui m'ont permis de traverser ce long chemin ardu. Le Dr Mahmoud Rouabhia, de par sa personne passionnée par son travail et ses recherches, a tout de suite créé chez moi une grande motivation qui m'a permis de finir mon projet de recherche.

J'aimerais aussi remercier le Dr Philippe Gauthier, membre de mon comité d'encadrement. Ses conseils dans le domaine de l'endodontie m'ont permis d'orienter et de faire évoluer mon projet de recherche dans la bonne voie.

Je remercie la Dre Juliana Nascimento Santos pour son support continu et sa patience durant ma formation en endodontie et la réalisation de mon projet de recherche.

Je remercie la Dre Mathilde Clairet pour ses conseils et ses disponibilités durant mon parcours de spécialité en endodontie et la réalisation de mon projet de recherche.

Enfin, je voudrais remercier ma précieuse famille et ma conjointe dont l'amour ne peut s'exprimer par des mots, ces derniers étaient toujours à mes côtés dans le bonheur et dans les moments difficiles.

Cette étude a été financée par les Fonds Émile-Beaulieu, de la Fondation de l'Université Laval, par la "*Canadian Academy of Endodontics*" et par l'"*American Association of Endodontists*".

Introduction

La dent est constituée de tissus durs (émail, dentine, cément) et d'un tissu mou en son centre, la pulpe. Cette dernière forme la chambre pulpaire au niveau de la couronne et les canaux radiculaires au niveau de la racine. Elle contient, entre autres, des fibres nerveuses, des vaisseaux sanguins et une composante cellulaire dont des fibroblastes, des odontoblastes et des cellules souches pulpaires. Ces dernières sont capables de se différencier. Cette différenciation joue un rôle primordial dans la régénération de certaines structures de la dent ^[1]. La dent peut être affectée par diverses pathologies, dont l'infection de la pulpe, causée par des bactéries opportunistes ^[2,3]. Les bactéries peuvent s'infiltrer dans la pulpe suite à un traumatisme, une carie étendue, une restauration profonde ou une fêlure coronaire rejoignant la pulpe ^[4,5]. L'infiltration bactérienne entraîne une inflammation et une infection et lorsque celles-ci progressent jusqu'à l'apex, les tissus pulpaires pourraient se nécroser. Selon le degré d'irritation, il peut y avoir formation d'un granulome, d'un abcès ou encore d'un kyste périapical ^[6]. L'un des buts principaux de la thérapie endodontique est d'éliminer l'infection pulpaire afin de rétablir l'homéostasie. Pour ce faire, différents traitements peuvent être utilisés. Le traitement de canal conventionnel est généralement réservé aux dents dont l'apex est mature. Pour les dents immatures dont l'apex n'a pas complété sa formation, d'autres traitements peuvent être envisagés. Parmi ceux-ci, on trouve la revascularisation qui est indiquée dans le cas des dents nécrosées. Ce traitement nécessite l'utilisation de certains agents endodontiques antimicrobiens notamment des mélanges d'antibiotiques sous forme de pâte : le triple antibiotique (métronidazole, ciprofloxacine et minocycline ; 1 :1 :1) et le double antibiotique (métronidazole et ciprofloxacine) ^[7]. L'hydroxyde de calcium peut être également utilisé comme agent antimicrobien en endodontie ^[8]. De plus, il est possible de contrôler l'infection par l'utilisation de peptides antimicrobiens (PAMs), naturels ou synthétiques. Les sources naturelles des PAMs sont diverses : plantes, insectes, vertébrés, bactéries, virus. Les PAMs synthétiques se sont avérés aussi efficaces que les PAMs naturels, sinon plus ^[9,10].

Récemment, notre équipe a démontré l'efficacité d'un peptide antimicrobien, le KSL- W, quant à la réduction de la croissance microbienne ^[10]. L'objectif du présent projet est d'évaluer l'effet du KSL-W sur les cellules souches pulpaire dans une perspective de l'utiliser pour le contrôle des infections endodontiques, dans le but de favoriser la revascularisation des dents immatures et ainsi leur croissance.

1. Revue de la littérature

1.1 Structures de la dent

Les dents sont des structures essentielles au bien-être et à la survie de l'Homme. Elles jouent un rôle primordial dans la mastication et sont indispensables à une phonation adéquate. Chez les êtres humains, la dentition primaire est progressivement remplacée par la dentition permanente durant la croissance. Cette transition est accompagnée d'une augmentation de la largeur du processus alvéolaire pour accommoder des dents plus volumineuses. En général, l'Homme adulte possède 32 dents divisées en quatre groupes: les incisives, les canines, les prémolaires et les molaires [11]. La dent est constituée de plusieurs structures distinctes en composition et en morphologie (figure 1). L'émail, couche externe de la dent, est secrété par des cellules épithéliales sous forme de cristaux durs minéralisés. Il est soutenu par une structure sous-jacente, moins minéralisée et plus résiliente, la dentine, composée d'un tissu conjonctif dur. En effet, selon des tests de compression, l'émail est environ 4 fois plus dur que la dentine [12]. Cette dernière est supportée par la pulpe dentaire, constituée d'un tissu conjonctif lâche [13].

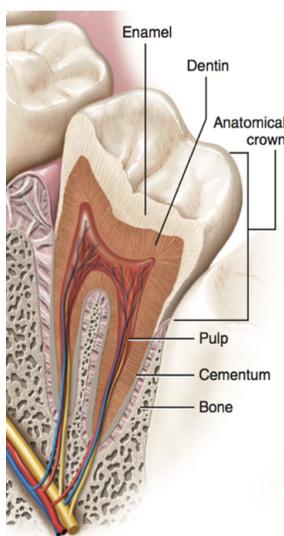


Figure 1. Ce schéma montre les structures de la dent : l'émail, la dentine, la pulpe et le ciment. La dent est ancrée dans l'os alvéolaire. (Tirée de Ten Cate. 2013) [14].

1.1.1 Émail

L'émail mature est la structure la plus dure et la plus minéralisée du corps humain. Il est composé de cristaux d'hydroxyapatite arrangés selon une architecture complexe appelés prismes d'émail ^[15]. Il contient environ 95,46 % de matière inorganique et 3,56 % de substance organique ^[16]. L'émail se développe à partir de l'organe de l'émail où des cellules épithéliales spécialisées appelées améloblastes sécrètent différentes protéines dont l'amélogénine (AMEL), l'améloblastine (AMBN) et l'énaméline (ENAM) ^[17] pour former une matrice préparatrice à la minéralisation ^[18]. Une fois la minéralisation de l'émail achevée, les améloblastes diminuent de façon importante leur sécrétion de protéines de l'émail lesquelles sont d'ailleurs dégradées par des protéinases. En conséquence, la matrice organique finit par disparaître. Ceci termine la croissance de l'émail en longueur et accélère sa croissance en largeur et en épaisseur ^[19]. Avec la minéralisation de la matrice organique, l'émail perd sa capacité de se régénérer et de se remodeler, faute de cellules. C'est pour cette raison que les scientifiques explorent différentes approches pour la synthèse ou la régénération de l'émail ^[20]. Le haut degré de minéralisation de l'émail et son organisation complexe lui permettent de résister aux forces de mastication et aux agressions externes comme les acides sécrétés par les bactéries responsables des caries dentaires ^[21]. Par ailleurs, même si l'émail est considéré comme un tissu inerte, il est perméable et permet un échange ionique avec l'environnement buccal. La perméabilité de l'émail et sa susceptibilité aux agressions environnementales sont diminuées par le fluor par exemple d'où l'intérêt de son application topique ^[22].

1.1.2 Dentine

La dentine est la substance majoritaire de la masse de la dent. Elle est recouverte par l'émail au niveau de la couronne et se trouve entre le cément et la pulpe au niveau radiculaire de la dent ^[23]. La dentine est sécrétée par les odontoblastes de la pulpe dentaire durant un processus connu sous le nom de dentinogénèse ^[24]. La dentine contient environ 50% de minéraux (apatite), 30% de composants organiques (notamment du collagène de type I) et 20% de fluides ^[25]. Étant moins minéralisée, la dentine est plus flexible et moins fragile comparativement à l'émail qui est dur. Ce

dernier a donc besoin du support de la dentine pour résister aux forces de la mastication^[12]. Dans la dentine, il existe des canaux microscopiques appelés tubulis dentinaires qui rayonnent vers la surface externe de la dent à travers le cément et l'émail^[26]. Les tubulis dentinaires sont remplis de liquide et lorsqu'ils sont soumis à une agression externe, il se produit un mouvement d'afflux qui se transmet aux fibres nerveuses pulpaire se traduisant par une sensation de douleur^[27]. La dentine peut être primaire, secondaire ou tertiaire. La dentine primaire est la dentine tubulaire régulière formée avant l'éruption de la dent. Elle est proéminente et se situe entre l'émail et la chambre pulpaire. Lors de l'éruption de la dent, la pulpe est stimulée par la mastication et, en réponse, elle commence à déposer des couches intermittentes de dentine secondaire qui est formée en continuité tubulaire avec la dentine primaire^[28]. La dentine secondaire est donc déposée à un rythme lent tout au long de la vie de la dent, un phénomène qui est responsable de la réduction de la taille de la chambre pulpaire^[29]. Enfin, la dentine tertiaire est une dentine plus ou moins irrégulière, formée en réponse à des stimuli nocifs tels que les lésions carieuses ou la formation de cavités^[30]. Dans les lésions carieuses débutantes ou à progression lente, les odontoblastes primaires détectent l'agression et, en réponse, déposent de la dentine tertiaire atubulaire. Ce processus est connu sous le nom de dentinogénèse tertiaire. Cependant, dans les processus carieux actifs et à progression rapide, aucune dentine tertiaire n'est formée, montrant que le processus inflammatoire affecte les odontoblastes primaires^[31]. Le type de dentine déposée peut varier dépendamment de l'importance de l'activité carieuse. En effet, une réponse réactionnelle est souvent associée à de petites lésions progressant lentement, ou suite à la restauration de certaines dents^[32]. Dans le cas de lésions plus actives, la mort des odontoblastes primaires est plus susceptible de se produire et une dentinogénèse réparatrice prend le relais^[33]. Ainsi, il est important de distinguer entre une dentinogénèse tertiaire réactionnelle et une dentinogénèse réparatrice.

1.1.3 Cément

Le cément est un tissu calcifié spécialisé comparable à l'os, qui recouvre la surface radiculaire de la dent. Contrairement à la dentine, le cément n'est pas vascularisé et ne

subit pas de remodelage dynamique. Il est mince à sa jonction avec l'émail et épais au niveau de l'apex^[34]. Sa composition renferme entre 50 à 60 % de minéraux (hydroxyapatite de calcium) et environ 35% de matière organique (fibres de collagène et glycoprotéines), en plus de l'eau^[35]. De ce fait, le ciment est moins minéralisé que l'émail, ce qui lui donne une structure molle^[36]. Le ciment se développe à partir du sac dentaire et est produit par des cellules spécialisées appelées cémentoblastes^[37]. Il existe deux principales formes de ciment avec des caractéristiques structurelles et fonctionnelles distinctes: le ciment acellulaire et le ciment cellulaire^[38]. Le premier se trouve dans la partie cervicale et le tiers moyen de la racine. Il assure l'adhérence de la dent à l'os alvéolaire adjacent par la prédominance des faisceaux de fibres de collagène minéralisé perpendiculaire à la jonction cémento- dentinaire^[39]. Enfin, le ciment cellulaire joue un rôle dans l'adaptation de la dent aux mouvements et à l'usure. Il intervient aussi dans la réparation des tissus parodontaux^[40].

1.1.4 Pulpe

La pulpe est le noyau vivant de la dent. Elle supporte les couches superficielles (émail et dentine) en leur prodiguant les nutriments nécessaires à leur survie. La pulpe est divisée en deux entités : pulpe coronaire et pulpe radiculaire. La première est localisée dans la chambre pulpaire qui se trouve au centre de la dent^[41], alors que la deuxième est délimitée par les canaux radiculaires qui s'étendent de la région cervicale à la région apicale de la racine. Dépendamment de la morphologie de la racine dentaire et du nombre des canaux, plusieurs classifications ont été proposées pour décrire les différents types de configuration canalaire, dont celle de *Vertucci*^[42]. En outre, il existe un foramen apical au bout de la racine par lequel passent des terminaisons nerveuses myélinisées et non myélinisées^[43] ainsi que des vaisseaux sanguins qui s'étendent jusqu'à la pulpe pour ensuite donner naissance à un riche plexus capillaire près de la périphérie^[44]. Ainsi, au niveau apical de la dent, se forment des réseaux vasculaires et neuronaux par lesquels la pulpe communique avec le milieu extérieur^[25,45]. La pulpe est constituée d'un tissu conjonctif richement vascularisé et innervé, mais confiné dans un espace restreint par la présence des structures dentaires adjacentes (émail et dentine) qui ne possèdent pas de capacité d'expansion. La pulpe a un débit sanguin

terminal et une circulation sanguine de petit calibre au niveau de l'apex. Ceci diminue considérablement la capacité de la pulpe à répondre aux stimuli nocifs de l'environnement extérieur^[46]. La pulpe a comme fonction principale de soutenir la dentine. Elle contient des cellules souches ayant la capacité de se différencier en odontoblastes lesquelles sont responsables de la formation de la structure dentinaire^[47].

Au début du développement de la dent, la pulpe et la dentine forment une seule structure connue sous le nom de complexe pulpo-dentine. Ainsi, de point de vue anatomique, la dentine et la pulpe sont intimement liées de sorte que les affections pathologiques ne peuvent toucher l'une sans affecter l'autre. Il est important de souligner que le concept du complexe pulpo-dentine est très simplifié et que la pulpe et la dentine sont en réalité deux entités distinctes autant au niveau de la constitution que de la fonction. La pulpe est formée de tissus mous alors que la dentine est constituée de tissus durs^[48]. La pulpe produit la dentine qui l'entoure, elle la nourrit et lui assure un rôle de protection et de réparation. En effet, la dentine est perméable et les irritants externes auxquels elle est exposée peuvent atteindre aisément la pulpe qui réagit en stimulant le système immunitaire et en induisant l'angiogenèse. De plus, la pulpe diminue la perméabilité de la dentine en créant un flux de fluides vers l'extérieur de la dent, ainsi qu'en déposant des minéraux pour former la dentine tertiaire^[49]. La pulpe contient les nerfs qui confèrent à la dentine sa sensibilité. Certaines fibres nerveuses pénètrent dans les tubulis dentinaires et entrent en contact avec les processus des odontoblastes. Ces processus peuvent jouer un rôle dans la transmission des stimuli depuis la surface de la dent jusqu'aux nerfs dans la pulpe dentaire^[50]. En effet, lorsqu'il y a une agression externe telle qu'une préparation de cavité, la membrane cellulaire des odontoblastes est endommagée. Il en résulte une libération du contenu intracellulaire riche en potassium dans le fluide de la dentine et dans celui de la pulpe. Ce qui serait à l'origine des sensations de douleur post-traitement^[51].

1.2 Tissus de support de la dent

Chez l'être humain, les dents sont fortement ancrées dans les os des maxillaires supérieurs et inférieurs afin de pouvoir accomplir leurs fonctions. Elles sont supportées

par des structures complexes (figure 2) constituées du cément, du ligament parodontal et de l'os alvéolaire [52]. Ce dernier est couvert par la gencive qui suit de près le contour de l'os alvéolaire qui lui est sous-jacent [53].

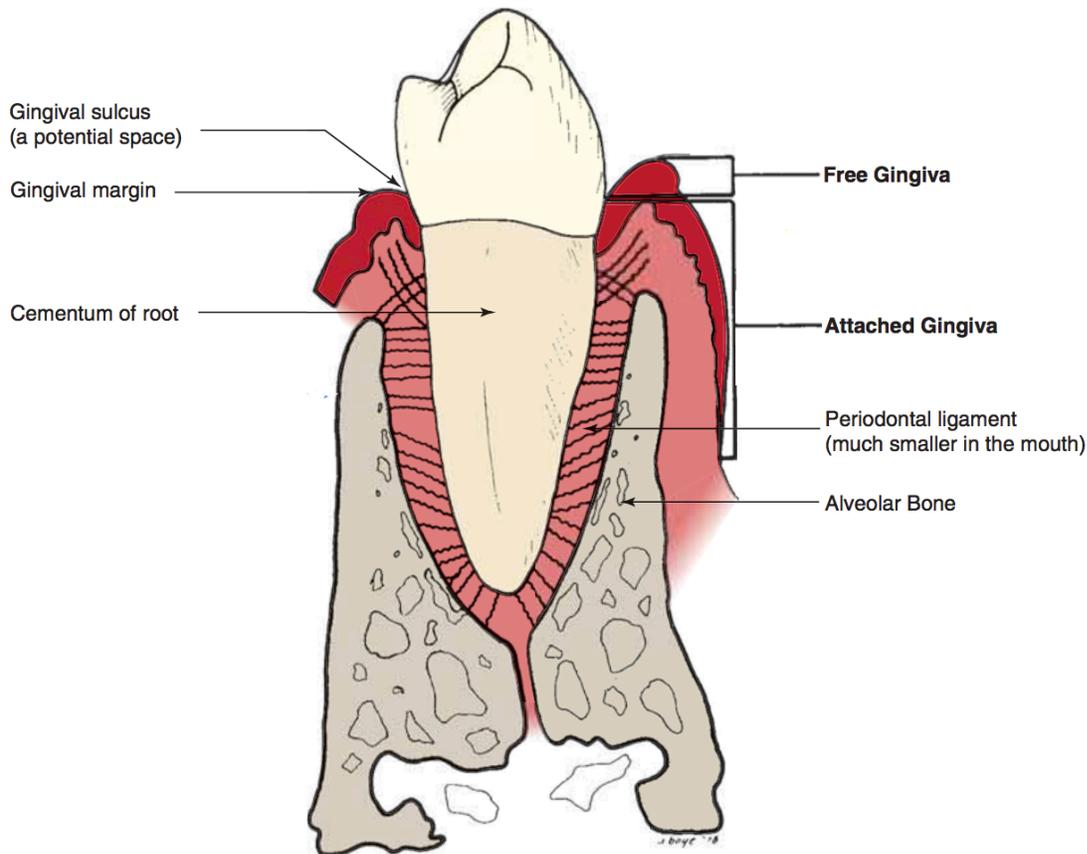


Figure 2. L'illustration montre l'environnement dans lequel les dents sont ancrées. La dent est soutenue par le parodonte. Celui-ci est constitué de l'os alvéolaire, de la gencive, du cément et du ligament parodontal. L'os alvéolaire et le cément entourent la racine, la gencive recouvre l'os et le ligament parodontal relie l'os au cément de la dent. (Tirée de Scheid et Weiss. 2011) [52].

1.2.1 Ligament parodontal

Le ligament parodontal est constitué d'un tissu conjonctif fibreux qui entoure la racine et la maintient attachée à l'os alvéolaire. Le ligament parodontal a plusieurs fonctions dont le support de la dent, sa proprioception et son éruption [54]. Il est aussi impliqué dans le remodelage osseux pendant le mouvement de la dent [55]. En outre, le ligament parodontal contient des cellules souches ayant le potentiel de se différencier en cellules spécialisées telles que les ostéoblastes et les chondrocytes. Ainsi, le ligament

parodontal constitue un réservoir de cellules qui peuvent être utilisées pour la réparation et la régénération des tissus durs^[56]. De plus, le ligament parodontal peut aider au bon positionnement des mâchoires pendant la mastication, car la stimulation électrique des récepteurs du ligament parodontal provoque un réflexe vigoureux de dépression de la mâchoire^[57]. Le tissu conjonctif dense du ligament parodontal comporte des fibres de collagène et des fibroblastes. Ces derniers sont responsables du remodelage continu du collagène par leur capacité de synthèse et de dégradation de celui-ci. Ainsi, les fibroblastes permettent aux fibrilles de collagène de s'adapter aux différentes exigences des mouvements de la dent^[58].

1.2.2 Os alvéolaire

Les os du maxillaire et de la mandibule contiennent des orifices, appelés alvéoles, qui entourent les racines des dents et auxquelles ces dernières sont attachées par des ligaments parodontaux. Les alvéoles sont entourées d'os de soutien avec lequel elles forment une unité anatomique. L'os de soutien comprend les plaques corticales et les septa osseux. Les plaques corticales sont en continuité avec les cortex du corps des mâchoires. L'os spongieux est interposé entre la paroi alvéolaire et les plaques corticales^[59]. L'os alvéolaire proprement dit représente une mince couche d'os compact qui constitue la paroi de l'alvéole et qui joue un rôle important lors du remodelage osseux^[60]. L'os alvéolaire proprement dit est désigné sur une radiographie sous le nom de *lamina dura* et semble être utile pour l'évaluation et le traitement des maladies parodontales^[61]. La surface de l'os alvéolaire présente généralement des zones de remodelage osseux qui sont liées aux déplacements des dents. Ainsi, à la suite de l'extraction d'une dent, le processus alvéolaire qui y est associé est graduellement perdu^[62]. Par ailleurs, la modification du processus alvéolaire par résorption/apposition peut être facilement réalisée par des traitements orthodontiques^[63].

1.2.3 Muqueuse orale

La cavité buccale est tapissée par une muqueuse constituée d'un épithélium et d'un tissu conjonctif sous-jacent. Cette muqueuse dont le rôle est de protéger les différentes structures de la bouche recouvre la surface des lèvres, des joues, du palais, du plancher buccal et de la langue. D'un point de vue histologique, il existe différents types

de muqueuses buccales : la muqueuse masticatoire et la muqueuse de recouvrement. La première est étroitement reliée à l'os sous-jacent par la *lamina propria* tandis que la deuxième comprend un épithélium non kératinisé supporté par un tissu conjonctif plus flexible^[64]. La gencive comporte un épithélium kératinisé; elle entoure la dent à l'endroit où la couronne et la racine se rejoignent et recouvre les structures alvéolaires des mâchoires. Elle comprend à la fois les gencives libres et attachées, et s'étend de la marge gingivale jusqu'à la jonction muco-gingivale. La gencive libre est la zone la plus proche de la couronne de la dent et est constituée d'un tissu qui n'est pas fermement attaché à l'os alvéolaire. Elle entoure chaque dent et s'étend de la marge gingivale jusqu'au sillon gingival libre^[65]. L'épithélium kératinisé confère à la gencive une résistance aux forces de mastication. Elle ne contient presque pas de fibres élastiques, contrairement à la muqueuse de recouvrement qui, elle, renferme un épithélium non kératinisé avec beaucoup de fibres élastiques lui donnant plus de flexibilité^[66]. La gencive est généralement de couleur rose ou rose corail, mais des variations existent, selon l'origine ethnique et l'âge de l'individu^[67].

1.3 Les pathologies dentaires

La dent et les tissus de soutien (le ligament parodontal et l'os alvéolaire) peuvent être affectés par plusieurs pathologies dont la carie dentaire^{[52] [69]}.

1.3.1 Maladie carieuse

La carie cause de l'inflammation pulpaire qui se produit suite à l'infiltration bactérienne au niveau de la pulpe. Parmi les principales bactéries en cause dans l'initiation et la progression de la maladie carieuse figurent les Gram positifs acidogènes dont les streptocoques et les lactobacilles^[70]. Les streptocoques du groupe Mutans comprennent, entre autres, les *Streptococcus mutans* et les *Streptococcus sobrinus*^[3]. Par ailleurs, les *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus casei* et *paracasei*, *Lactobacillus gasseri*, *Lactobacillus salivarius* et *Lactobacillus plantarum* sont les espèces des lactobacillus les plus impliquées dans les lésions carieuses^[2]. Ces bactéries acidogènes fermentent les glucides alimentaires en acide lactique, ce qui favorise la dissolution des cristaux d'hydroxyapatites de l'émail et de la dentine. Il en résulte une inflammation au niveau de la pulpe^[71]. Au fur et à mesure que la lésion carieuse progresse au niveau de la dentine (figure 3), une transition de bactéries Gram positif à prédominance facultative à des bactéries anaérobies s'opère. Cette transition est influencée par une modification de la concentration d'oxygène et de la disponibilité des nutriments dans le microenvironnement. Ainsi, la présence de nutriments comme le sérum, diffusant de la pulpe, favorise la croissance des bactéries protéolytiques au détriment des bactéries saccharolytiques. Les diverses bactéries impliquées dans la carie présentent des structures microbiennes telles que l'acide lipotéichoïque et les lipopolysaccharides, dotés de propriétés antigéniques^[3]. Lorsque les antigènes et les métabolites microbiens s'infiltrèrent dans les tubulis dentinaires pour se rendre dans la pulpe, la réponse immunitaire devient donc importante^[72]. Les bactéries envahissantes induisent l'activation des odontoblastes par le biais de leurs récepteurs appelés « *Toll-like receptors* ». Ces pathogènes stimulent la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires comme l'interféron gamma (IFN γ) et diverses interleukines (IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-5, IL-7). Des médiateurs comme le facteur de croissance endothélial vasculaire et le facteur de

croissance transformant bêta sont également sécrétés. Le premier induit la perméabilité vasculaire et l'angiogenèse^[73], alors que le deuxième favorise la minéralisation de la dentine et la sécrétion des métalloprotéinases matricielles (MMPs)^[74]. Les cytokines et les chimiokines sécrétées interviennent dans le recrutement des cellules immunitaires notamment les neutrophiles et les macrophages vers les tissus infectés^[72] et l'invasion bactérienne est ralentie par un flux dentinaire d'immunoglobulines et de protéines sériques et par le dépôt de dentine réactionnelle produite par les odontoblastes. La dentine déposée réduit la lumière des tubulis dentinaires afin de limiter l'infiltration bactérienne^[25]. Ainsi, une régulation locale de la réponse des odontoblastes face à l'invasions des bactéries cariogènes à travers l'initiation et l'élaboration de la dentine sclérosée et réparatrice est observée^[75].

Dans le cas où la progression des bactéries n'est pas arrêtée, les fibres nerveuses profondes sont stimulées, ce qui provoque la libération des neuropeptides vasoactifs, dont la substance P (SP). Ces derniers sont responsables de l'augmentation de la perméabilité vasculaire laquelle provoque une élévation du débit sanguin et déclenche des sensations douloureuses^[76]. Ces processus impliquent les principales cellules du système immunitaire: les monocytes, les macrophages, les neutrophiles, les basophiles, les cellules dendritiques, les mastocytes, les lymphocytes T et les lymphocytes B^[77]. Avec la progression de l'activité carieuse, l'expression de SP est significativement augmentée tout au long de la pulpe. La SP est sécrétée par une sous-population de fibres nerveuses afférentes nociceptives et l'augmentation de cette substance a été montrée dans divers sites d'inflammation^[78]. À ce stade, les cellules immunitaires tentent d'éliminer les microorganismes et les cellules mortes afin de contrôler l'inflammation. Également, ces cellules essaient de contrôler l'inflammation par la sécrétion de peptides comme la β -endorphine et la somatostatine pour rétablir l'homéostasie. La β -endorphine a un effet supprimeur sur les neuropeptides vasoactifs et la somatostatine a un rôle inhibiteur sur la libération de substance P^[72]. Ceci a été mis en évidence par une étude sur les rats avec des pulpes exposées *versus* des rats avec des pulpes non exposées. La β -endorphine et la somatostatine sont toutes deux produites en quantités accrues dans la pulpe dentaire exposée au cours de l'inflammation^[79]. Dans le cas où l'inflammation est exacerbée et où le système

immunitaire inné ne parvient pas à rétablir l'homéostasie, il y a une transition vers une réponse immunitaire adaptative. Finalement, si l'infection n'est pas contrôlée par le système immunitaire, il se produit une invasion bactérienne continue qui peut engendrer la mort des cellules pulpaire appelée nécrose pulpaire [3].

En conclusion, la maladie carieuse peut affecter la dent et les tissus qui la supportent, d'où la nécessité de comprendre la terminologie clinique pour reconnaître l'état de la pulpe et le parodonte, notamment la nécrose pulpaire et l'abcès dentaire [80,81].

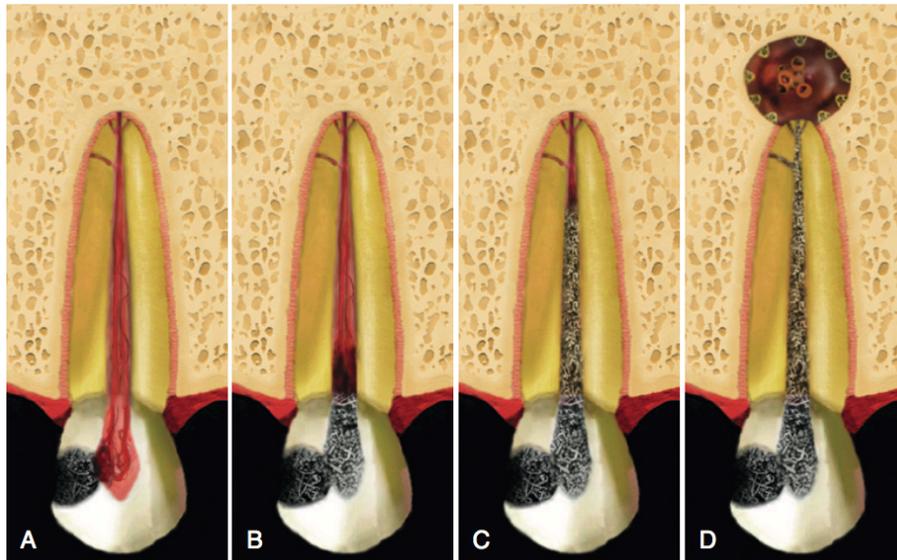


Figure 3. L'effet de la maladie carieuse sur la dent et les structures qui la supportent. A) La carie peut mener à l'inflammation pulpaire qui se produit suite à l'infiltration bactérienne au niveau de la pulpe. La carie est causée par des bactéries qui fermentent le sucre consommé en acide lactique. Ceci augmente l'acidité du milieu et occasionne la dissolution des cristaux d'hydroxyapatite de l'émail et de la dentine. B) Il en résulte une inflammation au niveau de la pulpe. C) Celle-ci mène à la nécrose. D) L'envahissement du canal radiculaire par les bactéries provoque une résorption osseuse au niveau du périapex (Tirée de Hargreaves et al, 2015) [82].

1.3.2 La nécrose pulpaire

Il existe des situations où les pulpes enflammées, mais non traitées finissent par se nécroser. On parle alors de nécrose pulpaire. Généralement, la pulpe nécrosée n'a aucune réponse au test au froid, mais, dans certains cas, elle peut répondre au test à chaud^[80]. Dans la majorité des cas, les tissus osseux où se trouve la dent nécrosée restent intacts. Plus précisément, la *lamina dura* qui entoure la racine et le ligament parodontal ne sont pas affectés^[80]. Dans le cas d'une dent nécrosée, le traitement de canal ou l'extraction sont les traitements préconisés. En l'absence de traitement, la nécrose pulpaire peut causer diverses pathologies telles que la parodontite apicale symptomatique et l'abcès périapical aigu ou chronique et même causer l'arrêt de la croissance radiculaire au niveau des dents immatures^[82].

1.3.3 Les lésions périapicales

Dans certains cas de dents avec des pulpes infectées ou nécrosées, l'invasion massive des bactéries produit des toxines pour détruire les neutrophiles. En réponse, ces derniers sécrètent des enzymes lysosomales. De plus, il se produit une flambée respiratoire « *respiratory burst* » ayant pour but de produire de nombreux radicaux libres dont l'oxyde nitrique^[83,84]. Les radicaux libres agissent comme agents bactéricides pour faire face à l'invasion bactérienne, mais peuvent cependant avoir un effet destructeur sur les cellules saines^[82]. Au site de l'inflammation et à la suite de la mort de cellules (neutrophiles, cellules bactériennes, etc.), le fluide devient purulent, mal oxygéné et acide. Ceci peut engendrer un abcès périapical. L'abcès est une collection focalisée et localisée d'exsudat purulent ou suppuratif renfermant des bactéries mortes ou vivantes, des cellules tissulaires désintégrées, des neutrophiles, des enzymes lysosomales et de la matrice extracellulaire^[85]. L'abcès dentaire peut se présenter sous forme aiguë ou chronique, et lorsqu'il diffuse dans les tissus, il évolue vers une cellulite. L'abcès périapical aigu est caractérisé par une enflure au niveau des tissus affectés et aussi par la formation de suppuration sans drainage, à l'inverse de l'abcès chronique où le drainage de pus est possible par le biais d'une fistule. La

formation d'abcès peut aussi causer la destruction du ligament parodontal et de l'os périapical^[81].

En endodontie et d'un point de vue histologique, les lésions périapicales les plus communes sont l'abcès périapical, le granulome et le kyste périapical. Une partie de ces lésions renferme des cellules épithéliales qui seraient dérivées des restes des cellules de Malassez. Ces cellules semblent être à l'origine de l'épithélium qui tapisse les kystes radiculaires. Par ailleurs, l'abcès périapical est un foyer d'inflammation aiguë caractérisée par la présence de leucocytes polymorphonucléaires (PMN), alors que le granulome périapical est une inflammation chronique infiltrée principalement de lymphocytes, de plasmocytes et de macrophages. Ensuite, les kystes périapicaux se divisent en deux catégories : le vrai kyste et le pseudo-kyste. Le vrai kyste est une lésion inflammatoire apicale avec une cavité distincte, complètement fermée et bordée d'une couche épithéliale, alors que le pseudo-kyste est une cavité bordée d'épithélium en continuité avec l'apex radiculaire. Selon l'étude réalisée par Nair et collègue, sur 256 spécimens analysés, 35% étaient des abcès périapicaux, 50% des granulomes et 15% de kystes. Les kystes, eux-mêmes étaient constitués à 61% de vrais kystes et 39% de pseudo-kystes^[6].

1.4 Les cellules souches

1.4.1 Cellules souches totipotentes/pluripotentes

Chez l'être humain, au stade du bouton embryonnaire, les cellules ont la capacité de se différencier en n'importe quel type de cellule spécialisée du corps humain. On parle alors des cellules souches totipotentes. Ensuite, au cours du développement de l'organisme adulte, une sous-population de cellules souches participe au développement de chacun des tissus constituant le territoire orofacial. Ces cellules sont pluripotentes et ont une propriété d'autorenouveaulement et de différenciation cellulaire spécialisée^[86]. Les cellules souches multipotentes ou cellules souches adultes, quant à elles, ont le pouvoir de se différencier en différents types de cellules, mais elles sont plus limitées que les cellules pluripotentes. Il est essentiel de savoir que les cellules souches dentaires appartiennent à la catégorie de cellules multipotentes^[87].

1.4.2 Cellules souches dans l'environnement oral

Lors du développement de la dent, les processus d'amélogenèse et de dentinogenèse sont respectivement responsables de la formation de l'émail et de la dentine, grâce à l'interaction entre l'épithélium interne de l'émail et les cellules ectomésenchymateuses de la papille dentaire. Même après l'éruption de la dent, des cellules souches demeurent présentes dans la pulpe dentaire; elles sont capables de réagir suite à une agression et contribuent à la réparation dentinaire ^[88].

Au niveau de la cavité buccale se trouvent des cellules souches pulpaire, des cellules souches du ligament parodontal, des cellules précurseurs des follicules dentaires ainsi que des cellules souches de la papille apicale (SCAP) ^[89]. Les cellules souches de la pulpe dentaire (CSPD) ont le potentiel de se différencier en une variété de types cellulaires tels que les chondrocytes, les ostéoblastes, les neurones, les cellules hépatiques, les cellules β des îlots pancréatiques et les cardiomyocytes ^[90]. Les CSPD et les SCAP sont impliquées dans la régénération et le développement de certaines structures dentaires, dont la dentine et la pulpe. Les cellules souches apicales ont la capacité de se différencier en odontoblastes et en adipocytes et sont impliquées dans le développement de la dentine radiculaire ^[91]. La figure 4 illustre les multiples types de cellules souches dans l'environnement buccal.

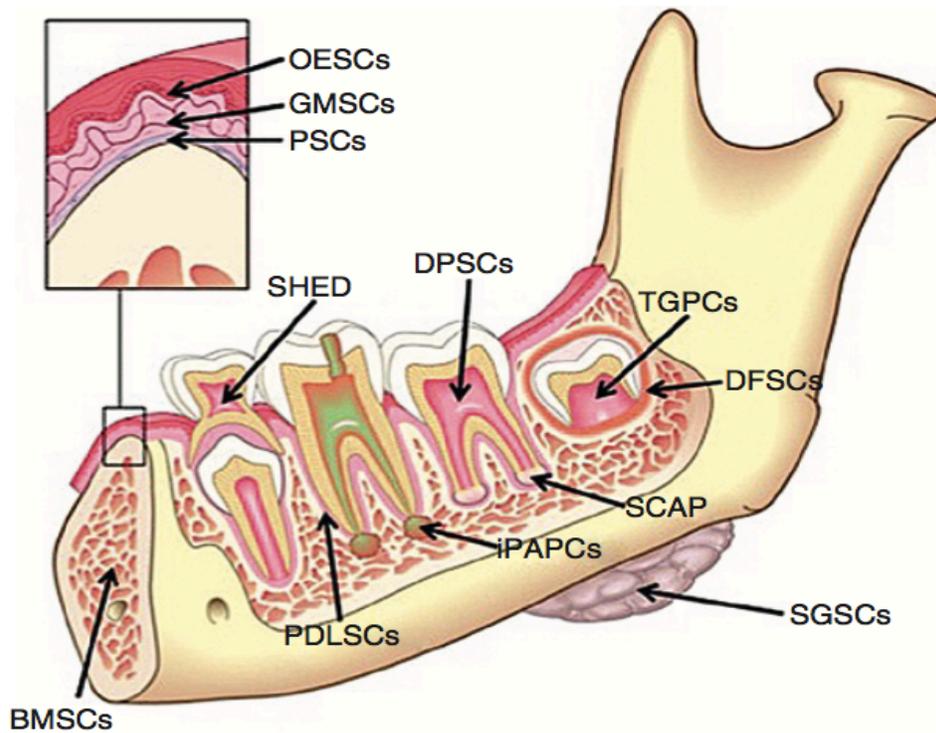


Figure 4. Illustration qui décrit les sources potentielles de cellules souches dans l'environnement buccal. Les types de cellules incluent les cellules progénitrices du germe dentaire (TGPCS); cellules souches de follicules dentaires (DFSCS); cellules souches des glandes salivaires (SGSCS); cellules souches de la papille apicale (SCAP); cellules souches de la pulpe dentaire (DPSCS); cellules progénitrices périapicales inflammées (IPAPCS); cellules souches de dents de lait exfoliées (SHED); cellules souches du ligament parodontal (PDLSCS); cellules souches de la moelle osseuse (BMSCS); cellules souches épithéliales buccales (OESCS); cellules souches mésenchymateuses d'origine gingivale (GMSCS); et cellules souches du périoste (PSCS) (Tirée de Hargreaves et al, 2015) ^[82].

1.4.3 Différenciation des cellules souches pulpaire et apicales

Au cours du développement de la dent, la gaine épithéliale de Hertwig (GEH) joue un rôle pivot au niveau de la différenciation des cellules souches dans l'environnement bucco-facial. La GEH induit la différenciation de ces cellules en odontoblastes ^[92]. L'effet de la GEH sur les odontoblastes se traduit par la sécrétion de la dentine au niveau de la région radiculaire ^[93]. Ensuite, dépendamment de la phase de développement de la dent, les odontoblastes peuvent dériver soit de la papille apicale, soit de la pulpe dentaire. Les odontoblastes qui proviennent de la papille apicale (odontoblastes primaires) sécrètent la dentine primaire et secondaire ^[94], alors que ceux de la pulpe

(odontoblastes de remplacement) sont plutôt responsables de la production de la dentine tertiaire ou réparatrice^[95].

Dans une étude *in vitro* réalisée en 2008, des cellules souches ont été prélevées de la pulpe dentaire et de la papille apicale à des fins d'analyses histologiques. Des différences entre les cellules souches de la papille apicale et celles de la pulpe dentaire ont été observées. En effet, les cellules de la papille apicale ont un potentiel de prolifération 2 à 3 fois plus important que celui des cellules de la pulpe. Cependant, aussi bien les cellules souches prélevées de la pulpe que celles de la papille apicale sont capables de se différencier en odontoblastes et en ostéoblastes^[96].

Les cellules souches pulpaires et les cellules souches de la papille apicale peuvent avoir un rôle important dans la régénération des tissus dentaires notamment par leur capacité à former un complexe de type pulpe-dentine et ont donc un potentiel énorme dans le traitement des pathologies d'origine endodontique^[47].

1.4.4 Utilité des cellules souches dans le domaine médical

1.4.4.1 Utilité des cellules souches en médecine

Généralement, les cellules souches pulpaires sont obtenues des dents extraites, et selon de nombreuses études ces cellules auraient des applications prometteuses en la régénération tissulaire et en médecine en général. Grâce à leur pluripotence, les cellules souches pulpaires pourraient être utilisées pour le traitement de certaines maladies comme les maladies neurologiques, le diabète et les maladies affectant les os et les cartilages^[97]. En effet, les patients diabétiques pourraient en bénéficier surtout pour le contrôle de la neuropathie diabétique. Dans une étude sur des rats atteints de neuropathie diabétique, la transplantation de cellules souches pulpaires par voie intraveineuse ou intramusculaire, a amené une amélioration significative de la coordination motrice et de la vitesse de conduction nerveuse^[98].

Plusieurs recherches scientifiques ont mis en évidence les propriétés intéressantes des cellules souches pulpaires^[99]. Également, avec la progression de la médecine dentaire et surtout les techniques utilisées en endodontie, la guérison tissulaire s'est grandement améliorée lors d'interventions endodontiques^[88].

1.4.4.2 Utilité en endodontie

L'énorme potentiel des cellules souches telles que les SCAP et les CSDP a ouvert la porte au développement de plusieurs techniques de régénération tissulaire dans le domaine d'endodontie, notamment en stimulant la revascularisation des tissus au niveau des dents immatures. Les dents immatures ayant subi un traitement endodontique non chirurgical conventionnel ont souvent un mauvais pronostic en raison de l'augmentation du risque de fracture. L'endodontie régénératrice représente une nouvelle modalité de traitement qui se concentre sur le rétablissement de la vitalité de la pulpe et le développement continu des racines^[100]. Une technique consiste à sur-instrumenter le canal au niveau des dents immatures permanentes afin de créer un saignement. Ceci favorise l'invasion du canal par les cellules souches pulpaire apicales qui stimulent la formation radiculaire^[101]. Il est également possible de transplanter des cellules souches directement au niveau du site atteint. Il s'agit du *Cell homing*^[102].

Des études ont été réalisées pour évaluer l'effet de différents matériaux endodontiques sur les cellules souches pulpaire quant à leur viabilité, leur attachement ou leur migration. L'une des études a montré que le silicate de tricalcium a pu induire la prolifération et la différenciation des cellules souches de la pulpe dentaire humaine^[103]. Également, l'hydroxyde de calcium est fréquemment utilisé pour stimuler la régénération de la dentine par la formation de ponts dentinaires au niveau des sites exposés de la chambre pulpaire^[104].

Vu les propriétés intéressantes des cellules souches et le développement de nouvelles techniques dans le domaine de l'endodontie, il est logique de tenter de rechercher des produits biocompatibles capables d'induire la différenciation des cellules souches pulpaire au bon moment et au bon endroit dans le but d'obtenir une guérison du site affecté. Les cellules souches pulpaire sont sans aucun doute une pierre angulaire dans la régénération tissulaire et surtout le traitement des maladies infectieuses au niveau des dents.

1.5 Les agents endodontiques antimicrobiens

En endodontie, l'élimination de l'infection microbienne du système canalaire est une condition nécessaire à la réussite des traitements de canaux. Or, il arrive des situations où le patient se présente avec une dent nécessitant un traitement de canal compliqué qui ne peut être réalisé en une seule séance. Ainsi, le patient se voit obligé de retourner pour un deuxième ou même parfois plusieurs rendez-vous pour finir ses traitements. C'est là que l'utilisation d'agents antimicrobiens au niveau des canaux infectés devient nécessaire afin d'éviter la prolifération microbienne. Parmi ces agents endodontiques, mentionnons les différentes combinaisons d'antibiotiques locaux et l'hydroxyde de calcium $\text{Ca}(\text{OH})_2$ [82].

1.5.1 Mélange des antibiotiques locaux

L'utilisation des antibiotiques systémiques dans le domaine dentaire est très fréquente, mais les chercheurs ont eu l'idée de les utiliser de manière locale en endodontie. L'application locale des antibiotiques permet au dentiste de cibler les bactéries du système canalaire, inaccessibles par l'instrumentation ou les protocoles conventionnels. Par conséquent, l'antibiothérapie locale devient un complément important au traitement endodontique conventionnel [105]. Le traitement local a évolué en combinant plusieurs antibiotiques afin de créer un mélange capable d'éliminer le plus de microorganismes. Parmi les nombreuses combinaisons d'antibiotiques développées, citons le triple antibiotique (TAP)- utilisé pour la première fois par Sato et ses collègues en 1996 [106] et le double antibiotique (DAP) [107]. Le triple antibiotique consiste en une combinaison du métronidazole, de la ciprofloxacine et de la minocycline; alors que le double antibiotique contient du métronidazole et de la ciprofloxacine [105,108]. Il est essentiel de noter que l'utilisation des TAP et DAP de façon locale est actuellement réservée aux procédures endodontiques régénératives. Cette procédure représente une modalité de traitement alternative pour les dents immatures avec des pulpes nécrotiques [114].

1.5.1.1 Mode d'action

La ciprofloxacine est un antibiotique appartenant à la famille des quinolones. Elle exerce un effet bactéricide par son action inhibitrice sur l'enzyme ADN-gyrase, protéine essentielle à la réplication de l'ADN bactérien ^[109].

Le métronidazole est un agent antimicrobien qui appartient au groupe des nitroimidazoles. Il inhibe la synthèse d'ADN et agit sur les bactéries anaérobies et certains protozoaires. Le métronidazole possède ainsi des effets à la fois bactéricides et antiprotozoaires. De plus, le métronidazole exerce des effets anti-inflammatoire et immunosuppresseur lorsqu'il est appliqué de manière topique ^[109].

La minocycline est un antibiotique de la famille des tétracyclines qui inhibent la synthèse des protéines bactériennes en se liant aux ribosomes. Cet antibiotique a un effet bactériostatique ^[109].

1.5.1.2 Utilité en endodontie

Hoshino et ses collègues ont réalisé une étude *in vitro* visant à tester l'efficacité antibactérienne des antibiotiques : ciprofloxacine, métronidazole et minocycline, seuls ou en combinaison, contre les bactéries impliquées dans les infections de la dentine et des pulpes nécrosées. Utilisé seul, aucun des antibiotiques n'a permis l'élimination complète des bactéries. Cependant, en combinaison, ces antibiotiques étaient capables de stériliser la dentine radiculaire infectée ^[110]. L'efficacité de la pâte triple antibiotique (métronidazole, ciprofloxacine et minocycline) a déjà été évaluée au niveau des dents immatures atteintes de parodontite apicale. Selon une étude de cas, le traitement a été appliqué au niveau d'une incisive centrale droite immature d'une patiente âgée de 8 ans. En plus d'être atteinte d'une lésion périapicale importante, la dent avait une fracture coronaire. La dent a été traitée en remplissant le canal avec une pâte de triple antibiotique. Après 4 mois, la lésion a complètement disparu, tel que révélé par une évaluation radiographique. Le suivi réalisé après 1 an a montré, toujours selon les radiographies, que la racine de la dent s'est complètement formée avec une fermeture de l'apex radiculaire. Il a été conclu que la pâte du triple antibiotique favorise la guérison des dents permanentes dont la croissance radiculaire n'est pas complétée ^[111].

De plus, la conception de combinaisons d'antibiotiques sans minocycline tel que le double antibiotique a pour but d'éviter la décoloration de la dent et de réduire les risques de déminéralisation dentaire associés à l'utilisation de la minocycline [112,113].

1.5.1.3 Effets secondaires

L'antibiothérapie locale en endodontie a connu un succès remarquable, mais reste qu'elle a de multiples effets secondaires dont la décoloration des dents et une toxicité sur les cellules souches de la dent [113,114].

Une étude sur l'effet direct des antibiotiques sur les cellules souches de la papille apicale (SCAP) a montré que les antibiotiques administrés par voie intracanalair ont des effets cytotoxiques sur ces cellules. Les auteurs ont évalué les antibiotiques suivants : le triple antibiotique (métronidazole, ciprofloxacine et minocycline avec un ratio 1: 1: 1), le double antibiotique (métronidazole et ciprofloxacine avec un ratio 1: 1) et le triple antibiotique modifié (métronidazole, ciprofloxacine et céfacleure avec un ratio 1: 1: 1). Ces antibiotiques, lorsque, utilisés à 10 mg/ml et 100 mg/ml (concentrations cliniques), ont eu des effets néfastes sur les cellules souches dont la viabilité était inférieure à 20 %. De plus, une viabilité de 33 % à 56 % a été notée lorsque les cellules ont été exposées à 1 mg/ml [114].

1.5.2 L'hydroxyde de calcium

L'hydroxyde de calcium a été introduit en 1920 par Hermann. Depuis, il est fréquemment utilisé en endodontie [115].

1.5.2.1 Propriétés de l'hydroxyde de calcium

L'hydroxyde de calcium est reconnu pour son activité antimicrobienne. Vu sa capacité de dissoudre les tissus organiques et d'inactiver les endotoxines bactériennes, il est proposé comme médicament intra-canalair. De plus, il aide à inhiber la résorption des structures dentaires et à stimuler la formation des tissus durs, favorisant ainsi la réparation de la dent [116]. Dans une solution aqueuse, l'hydroxyde de calcium se dissocie en ions calcium et ions hydroxydes, donnant un pH fortement alcalin avoisinant 12,5 d'où l'activité antimicrobienne de ce matériau [115].

1.5.2.2 Utilisation de l'hydroxyde de calcium en endodontie

L'hydroxyde de calcium est incorporé dans la composition de divers agents de coiffage pulpaire. Son application sur la pulpe produit un effet initial se traduisant par une nécrose pulpaire superficielle causée par les ions hydroxydes. Cette nécrose est limitée par une zone ferme de tissu vital et engendre une légère irritation. Ceci stimule le processus de réparation grâce à la prolifération et la migration des cellules pulpaires au niveau de la pulpe exposée. Ainsi, la fonction de la pulpe est restaurée par la formation de tissus s'apparentant à la dentine et aussi par la présence d'ions calcium qui contribuent à la minéralisation du site atteint^[117]. L'innocuité de l'hydroxyde de calcium sur les cellules de la papille apicale a été démontrée. En effet, il a été montré que l'hydroxyde de calcium, à des concentrations variant de 0,01 à 100 mg/ml, n'affectait pas la survie ni à la prolifération des cellules souches de la papille apicale. Ce résultat est corroboré par des études qui ont montré que l'hydroxyde de calcium a le potentiel d'induire la formation de dentine réactionnelle lorsqu'il est utilisé comme matériau de revêtement dans le coiffage pulpaire vital^[114]. Cependant, une étude réalisée sur des fibroblastes de la pulpe dentaire a conclu à une cytotoxicité de l'hydroxyde de calcium lorsqu'il a été utilisé à des concentrations de 1 et 10 mg/ml^[118].

1.5.2.3 Effets secondaires

L'utilisation de l'hydroxyde de calcium a plusieurs avantages, mais présente cependant certains points faibles. Dans la majorité des cas, des résidus d'hydroxyde de calcium demeurent sur les parois même après un bon nettoyage et une bonne irrigation du canal^[119]. Le $\text{Ca}(\text{OH})_2$ résiduel au niveau des parois radiculaires peut interférer au niveau du scellement et de l'obturation finale. En effet, l'interaction éventuelle entre l'hydroxyde de calcium et les ciments à base d'oxyde de zinc-eugénol pourrait inhiber la formation d'un chélate d'eugénolate de Zinc. De plus, les ciments à base d'oxyde de zinc, formés en présence d'hydroxyde de calcium avaient une consistance granuleuse et friable, ce qui a un impact négatif sur l'obturation canalaire^[120]. Les limitations de l'utilisation à long terme de l'hydroxyde de calcium doivent être mentionnées. En effet, plusieurs études ont montré un effet négatif de l'hydroxyde de calcium sur les propriétés mécaniques de la dentine radiculaire. L'utilisation de cet agent pourrait mener à la

fracture dentinaire au niveau cervical de la dent lorsque celle-ci y est exposée pour une période dépassant 5 semaines. L'hydroxyde de calcium nécessite environ 4 semaines pour pénétrer dans la partie organique de la dentine qui est encapsulée par l'hydroxyapatite inorganique. Le pH très alcalin de ce médicament peut dénaturer la matrice organique et diminuer ainsi la résistance de la dentine à la fracture radiculaire^[121]. Bien que l'hydroxyde de calcium possède une large activité antimicrobienne contre les microorganismes endodontiques communs, il demeure moins efficace contre certains pathogènes comme *E. faecalis* et *C. albicans*^[115,116].

1.6 Les traitements endodontiques

En endodontie, les différentes modalités de traitements consistent à retirer les tissus pulpaire infectés et à les remplacer par des matériaux inorganiques tels que la gutta-percha et des ciments endodontiques. En retirant la pulpe, la dent perd sa vitalité et devient fragile et susceptible à la fracture^[122]. C'est la raison pour laquelle les stratégies de traitement permettant de rétablir les fonctions originelles de la pulpe des dents immatures fragiles deviennent intéressantes. Et c'est ainsi que l'émergence de la médecine régénératrice avec la possibilité de la régénération tissulaire prend toute son importance^[123].

Dans un passé assez récent, le traitement d'une dent permanente immature nécrotique était suivi d'une apexification ou d'une extraction si un traitement prosthodontique ou orthodontique est envisagé^[82]. La modalité d'apexification utilise l'instrumentation canalaire, suivie par des changements périodiques de la médication composée de Ca(OH)_2 ; qui sont, généralement, remplacés tous les 3 mois jusqu'à ce qu'un tissu calcifié se forme au niveau de l'apex. Ceci implique de multiples visites chez le dentiste et des coûts inévitablement élevés. Comme alternative, l'utilisation d'un bouchon apical à base de MTA a été préconisée et présente l'avantage de réaliser l'apexification en 1 ou 2 séances. Néanmoins, cette approche ne favorise que la fermeture apicale; elle ne permet pas le développement radiculaire continu^[124]. Ainsi, cette stratégie a été remise en question à la lumière des nouveaux concepts de régénération tissulaire qui proposent la complétion de la formation de la longueur et de l'épaisseur des parois radiculaires des dents. Cette idée est appuyée par l'identification récente des cellules souches au niveau de la papille apicale (SCAP)^[124]. Ces cellules pluripotentes, capables de se différencier en d'autres cellules essentielles à la régénération tissulaire ont ouvert la voie à de nouvelles modalités de traitement permettant de préserver les dents immatures non vitales^[125]. La revascularisation et la régénération des tissus de la pulpe font désormais partie de ces nouveaux traitements^[126,127].

1.6.1 La revascularisation

La revascularisation est une approche qui cible les dents immatures permanentes non vitales. Après nettoyage du canal et application locale d'une médication antimicrobienne, le canal est sur-instrumenté apicalement pour créer un saignement jusqu'au tiers cervical afin de créer un "scaffold". Par la suite, un matériel endodontique comme le MTA est placé sur le sang coagulé avec une restauration coronaire étanche^[101]. Le fait de créer un caillot sanguin à l'intérieur du canal pourrait fournir des facteurs de croissance et des cellules souches favorisant la formation continue de la racine (Lovelace et coll. 2011).

La figure 5 décrit les différentes étapes de la procédure de revascularisation pour le traitement des dents permanentes immatures nécrosées.

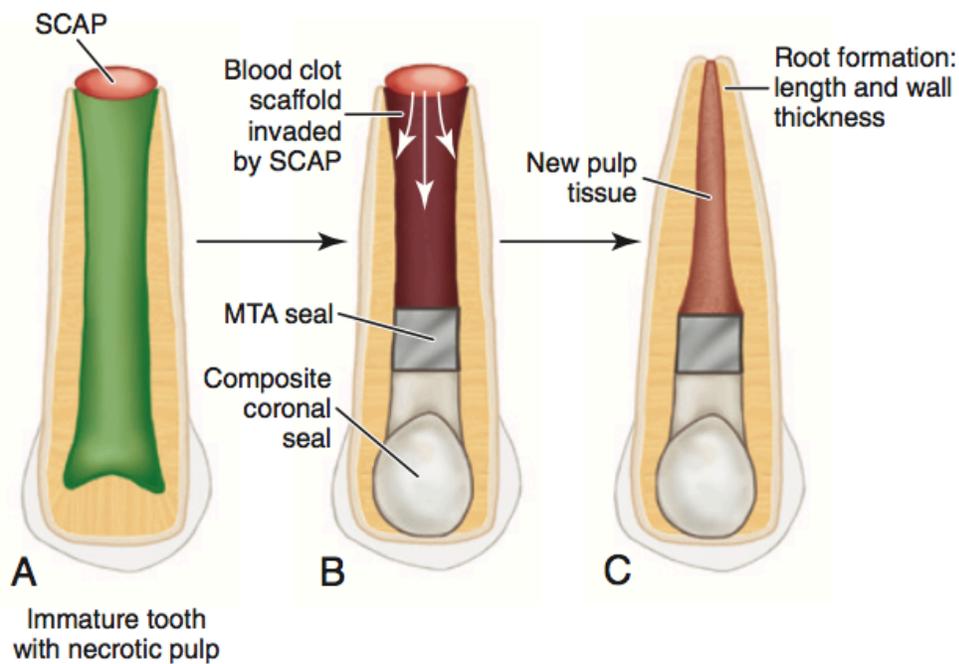


Figure 5. Les différentes étapes de la revascularisation. A) Dent permanente immature, non vitale, montrant la papille apicale riche en cellules souches, SCAP (*stem cells apical papilla*) au niveau de l'apex. B) Après que le canal ait été médicamenté avec un agent antimicrobien tel que la pâte du triple antibiotique ou l'hydroxyde de calcium, il est surinstrumenté pour induire un saignement jusqu'au niveau cervical. Un caillot de sang ainsi formé est revêtu de MTA et le tout est scellé avec une restauration étanche. Ceci forme un échafaud qui crée un environnement propice à l'invasion des cellules souches de la papille apicale. C) La maturation radriculaire (croissance en longueur et épaississement des parois radiculaires). (Tirée de Hargreaves et al, 2015)^[82].

Il est essentiel de noter que l'apexification avec du MTA n'induit pas la croissance radiculaire de la dent comme c'est le cas de la revascularisation. Ainsi, l'apexification n'améliore pas la force du canal radiculaire du fait qu'il n'y a ni épaissement ni croissance en longueur des parois radiculaires^[128]. Suite à la revascularisation, le tissu dur formé dans les canaux des dents immatures est un tissu minéralisé et hétérogène comme l'ont montré des études sur des animaux^[129]. Ce tissu ressemble à du ciment, à de l'os et à des tissus mous qui semblent s'apparenter à un ligament parodontal plutôt qu'à de la pulpe^[130]. De plus, selon des études chez l'homme, le tissu généré à la suite de la revascularisation peut ressembler à du tissu pulpaire, à du tissu du ligament parodontal, à des tissus du ciment ou de l'os. Cette variabilité pourrait être liée à la survie imprévisible des cellules souches de la papille apicale^[129]. La revascularisation est un traitement préconisé pour les dents permanentes immatures nécrotiques. C'est une procédure qui permet l'induction du développement des racines. Une étude de cas (figure 6) a décrit le traitement réussi de revascularisation d'une première molaire mandibulaire immature et nécrotique. Il y a eu une résolution des symptômes, une disparition du trajet fistuleux et aussi une guérison osseuse au niveau de la furcation et de la région périapicale^[127].



Figure 6. La revascularisation d'une molaire permanente immature avec une pulpe nécrotique. A) Radiographie périapicale préopératoire de la première molaire mandibulaire droite avec carie étendue et trajet fistuleux. Il est important de noter les racines immatures, la résorption apicale de la racine mésiale et les lésions radioclares au niveau du périapex et de la furcation. (B) Radiographie périapicale postopératoire après le traitement de revascularisation (désinfection, induction du saignement, mise en place d'un agent enrichi de calcium sur le caillot sanguin, mise en place de la base en verre ionomère et restauration avec une couronne en acier inoxydable. (C) Radiographie périapicale postopératoire après 15 mois. Le trajet fistuleux a disparu. Il faut aussi noter la guérison osseuse au niveau de la furcation et de la région périapicale, la croissance en longueur des racines associées avec l'épaississement des parois radiculaires. (Tirée de Nosrat et al, 2011)^[127].

1.6.2 La régénération des tissus de la pulpe

L'endodontie dégénérative vise à régénérer les tissus pulpaire atteints de manière irréversible par des tissus pulpaire sains afin de revitaliser la dent affectée. Ceci est possible par deux stratégies : la transplantation directe de cellules souches de la pulpe ou le guidage cellulaire « *Cell homing strategy* ». La première technique requiert le transfert de cellules souches de manière exogène dans la dent affectée, une procédure complexe et coûteuse. La deuxième stratégie consiste à introduire des molécules bioactives dans la dent dans le but de recruter des cellules souches endogènes de l'hôte. Et ce afin de stimuler le processus de réparation et de régénération des tissus, une procédure qui est plus faisable cliniquement^[131].

La transplantation de cellules souches exogènes dans le système canalaire de l'hôte s'est montrée capable de régénérer des tissus pulpaire de la dent. Ces cellules ont été enrobées par des « échafauds » renfermant des molécules de signalisation. Par ailleurs, avec des modèles animaux, les chercheurs ont pu montrer la régénération du complexe pulpe-dentine à la suite de la transplantation de cellules souches exogènes. De plus, des cellules souches isolées à partir de bourgeons dentaires etensemencées sur des matrices « échafauds » étaient capables de former des dents ectopiques *in vivo*^[132]. Cependant, la thérapie dégénérative basée sur la transplantation de cellules souches souffre de plusieurs inconvénients. C'est une procédure longue et complexe du fait qu'elle requiert la culture et la sélection de populations spécifiques de cellules souches *in vitro*. D'un point de vue clinique et scientifique, l'approche par guidage cellulaire « *Cell homing* » peut contourner de nombreux obstacles liés à la transplantation cellulaire. Le guidage cellulaire consiste à recruter des cellules progénitrices endogènes dans des compartiments anatomiques de l'hôte sont bien délimités tel qu'un canal radiculaire^[131]. Les chercheurs ont proposé de recruter des cellules souches endogènes se trouvant dans les régions périapicales des dents par des effets chimiotactiques exercés par des molécules bioactives intégrées dans des « échafauds ». Ces molécules stimulent la différenciation des cellules souches en odontoblastes, en cellules endothéliales et aussi en cellules nerveuses tout en les orientant vers des directions afin d'initier la régénération de la pulpe dentaire^[133].

1.7 Les peptides antimicrobiens

1.7.1 Introduction

L'utilisation massive et inadéquate des antibiotiques a causé la sélection et la propagation de souches bactériennes multirésistantes à travers le monde. La résistance microbienne aux antibiotiques est devenue, à l'heure actuelle, une menace sérieuse pour la santé mondiale, causant des millions de décès annuellement^[134]. Face aux antibiotiques, les microorganismes ont évolué *via* l'acquisition de nouvelles propriétés (génétiques ou non génétiques) leur permettant de survivre même aux antibiotiques puissants^[135]. L'amélioration des traitements actuels et le développement de nouveaux agents antimicrobiens deviennent une nécessité de plus en plus pressante. Ainsi, les PAMs constituent une voie prometteuse dans la lutte contre la résistance microbienne aux antibiotiques. Les PAMs agissent sur les microorganismes principalement *via* la destruction de la membrane cellulaire. L'action rapide des PAMs fait en sorte que les microorganismes ne peuvent évoluer pour y résister^[135,136]. Présentement, plus de 5000 PAMs pouvant agir sur les bactéries, les champignons, les virus et même sur les cellules cancéreuses ont été rapportés dans la littérature scientifique^[9,136–138].

1.7.2 Historique

La découverte du premier peptide antimicrobien remonte à 1939, l'année où René Jules Dubos a extrait un agent antimicrobien d'une souche de *Bacillus* et a montré sa capacité de protéger des souris contre une infection à pneumocoques^[139]. En 1941, un autre PAM, la tyrocidine, fut découvert. Il était efficace aussi bien contre des bactéries Gram négatifs que des bactéries Gram positifs^[140]. Par la suite, en 1956, ce fut la défensine qui a été isolée des leucocytes des lagomorphes^[141]. L'existence de peptides antimicrobiens dans des leucocytes d'origine humaine a été mise en évidence en 1963^[142]. Cependant, ces découvertes ont été éclipsées par l'utilisation thérapeutique de la pénicilline dans les années 1940 qui a marqué le début de l'âge d'or des antibiotiques et a conduit à une perte d'intérêt pour le potentiel thérapeutique des PAMs. L'apparition de souches microbiennes pathogènes multirésistantes dans les

années 1960 a toutefois éveillé l'intérêt des scientifiques pour les PAMs comme molécules faisant partie de la défense de l'hôte^[143,144].

1.7.3 Activité (rôle) des PAMs

Aujourd'hui, nous savons que les peptides antimicrobiens (PAMs) sont produits par tous les organismes multicellulaires comme une première ligne de défense contre les microbes^[145,146]. Les PAMs ont une large activité leur permettant de tuer directement des bactéries, des levures, des champignons, des virus et même des cellules cancéreuses^[147,148]. Les microbes aussi produisent des PAMs pour défendre leur environnement^[149,150]. Chez les eucaryotes supérieurs, certains PAMs ont également un rôle immuno-modulateur avec des effets variés, similaires aux cytokines et aux facteurs de croissance, en régulant différentes activités: chimiotaxie, recrutement, activation et différenciation des leucocytes, angiogenèse, expression des facteurs pro-inflammatoires, le tout afin de maintenir une homéostasie immunitaire^[9,144,151]. Il a été proposé que, en cas d'infection, les PAMs peuvent tuer directement les pathogènes, initier le recrutement et l'activation des cellules immunitaires et, par ailleurs, empêcher une réponse inflammatoire excessive au site de l'infection^[9,144,151].

1.7.4 Classification

Les PAMs sont des oligopeptides dont le nombre de résidus d'acides aminés varie de 5 à plus d'une centaine^[9]. Malgré leur diversité, les PAMs naturels sont réunis en 3 groupes selon la structure que le peptide adopte: hélices α ; feuillets β ; structures aléatoires, étendues ou enroulées, riches en un ou plusieurs acides aminés (tryptophane, proline et arginine, glycine ou histidine) et certains PAMs peuvent renfermer deux structures différentes^[152]. Les PAMs ayant une structure en hélices α sont les plus abondants et la plupart ont été isolés des liquides extracellulaires d'insectes, d'amphibiens, de mammifères et d'autres vertébrés. C'est notamment le cas de la magainine de la grenouille (des amphibiens) et du peptide humain cathelicidine LL37 qui a fait l'objet de nombreuses études. Cependant, de nombreux PAMs ont une structure aléatoire en milieu aqueux et n'adoptent une structure secondaire (hélices α ou feuillets β) que dans un environnement hydrophobe tel que la membrane bactérienne^[9,136,144,152-154]. Des peptides tels que les bactécines et les défensines

sont caractérisés par une structure en deux ou plusieurs feuillets β stabilisés par des ponts disulfures. Les cathelicidines et les défensines sont d'ailleurs les PAMs les plus représentés chez les vertébrés^[151]. Les histatines d'origine humaine sont riches en histidine et les indolicines des leucocytes bovins renferment plusieurs résidus tryptophane et arginine^[144,154].

Les PAMs d'origine microbienne sont différents de ceux des vertébrés, car ils ne sont pas synthétisés sur des ribosomes. Ils renferment souvent des structures cycliques ou branchées et peuvent contenir des résidus d'acides aminés non protéogéniques tels des acides aminés D. Ils peuvent également être glycosylés, acétylés, halogénés ou hydroxylés. Les exemples les plus notables des peptides microbiens sont la polymixine B (produite par *Bacillus polymyxa*) et la vancomycine (produite par *Amycolatopsis orientalis*)^[144]. Ces deux PAMs sont des antibiotiques approuvés par la FDA et efficaces contre des souches résistantes (ex. *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*)^[144].

1.7.5 Structure et mode d'action des PAMs

La majorité des PAMs décrits dans la littérature sont cationiques, cependant, certains PAMs anioniques ont été rapportés tels que la maximin-H5 des amphibiens et la dermicidine sécrétée par les glandes sudoripares humaines^[155-157]. Les PAMs cationiques sont généralement constitués de 10 à 50 résidus d'acides aminés avec une charge globale positive (comprise entre +2 et +9). Dans la structure tridimensionnelle des peptides, les acides aminés basiques (chargés positivement) et les acides aminés hydrophobes sont distribués de manière à former deux faces opposées. Par conséquent, les peptides adoptent une structure qui est à la fois hydrosoluble et hydrophobe, d'où leur caractère amphipathique^[9,136,144]. Selon leurs effets, les PAMs cationiques sont répartis en deux groupes majeurs: ceux qui déstabilisent la membrane microbienne et ceux qui pénètrent dans la cellule sans destruction de la membrane pour agir sur des cibles intracellulaires (machineries de synthèse des protéines et des acides nucléiques). Ces derniers entrent dans la cellule par passage direct ou par endocytose. Dans les deux cas, l'action des PAMs commence par une interaction avec la membrane^[136,144]. Les interactions des PAMs cationiques avec les surfaces

microbiennes chargées négativement lipopolysaccharides (LPS, dans le cas des bactéries Gram négatifs) ou acides lipoteichoïques (dans le cas des bactéries Gram positifs) sont induites par des forces électrostatiques s'étendant sur une longue distance de la membrane. L'activité antimicrobienne des PAMs est fortement corrélée à leur charge positive et à leur caractère amphipathique^[158,159]. Deux modèles ont été proposés pour décrire l'action des PAMs sur la membrane : modèle de tonneau/pores où les PAMs perturbent la bicouche lipidique entraînant la formation de pores transmembranaires et le modèle du tapis où la membrane est amincie jusqu'à sa dissolution^[136].

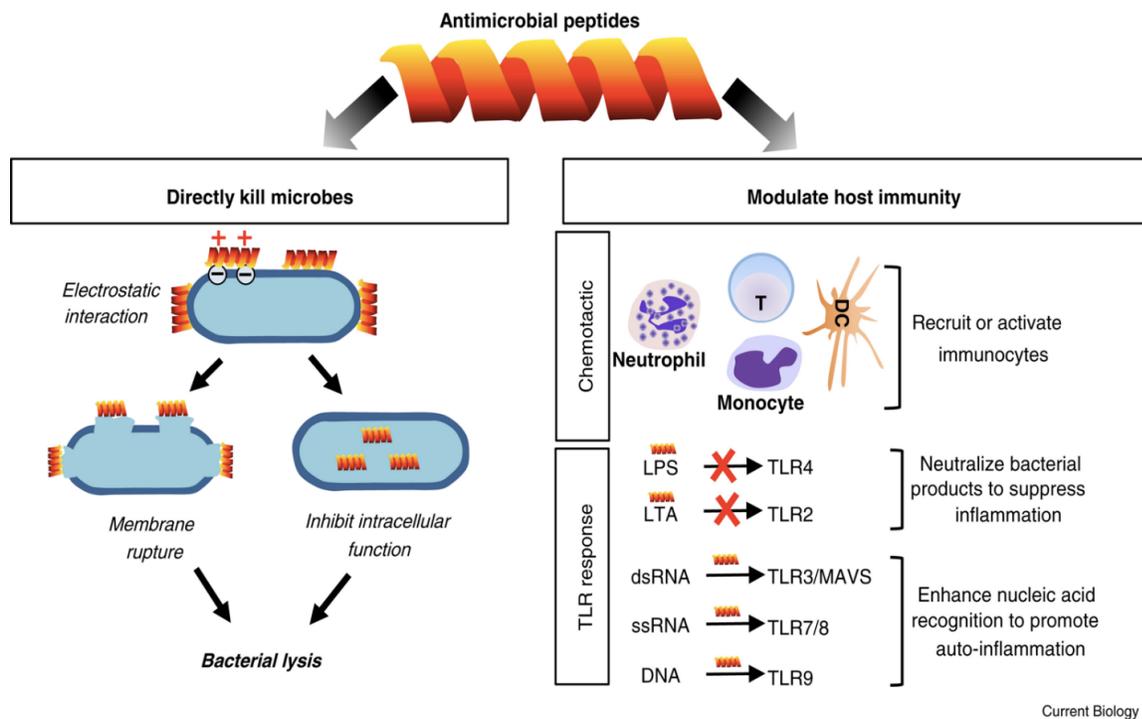
De nombreux PAMs cationiques se répartissent le long de la membrane bactérienne, ce qui crée une tension considérable sur la bicouche lipidique et conduit à l'extension de la couche externe jusqu'à la rupture de la membrane (d'une façon localisée ou généralisée) et la lyse de la cellule bactérienne^[135].

Le mode d'action des PAMs diffère entre les bactéries Gram négatifs et les bactéries Gram positifs. Pour les bactéries Gram négatifs, les PAMs sont accumulés près de la membrane externe et certains PAMs peuvent même la traverser par un mécanisme d'échange ionique où les peptides cationiques entrent en compétition avec les ions Ca^{2+} et Mg^{2+} liés aux lipopolysaccharides. Ces peptides ont ensuite accès à la membrane interne ainsi qu'aux cibles intracellulaires (protéines, acides nucléiques, organites). Pour les bactéries Gram-positifs, la paroi cellulaire présente une structure poreuse que les PAMs accumulés semblent pouvoir traverser assez facilement^[160,161].

Il est à noter que l'action d'un PAM sur les membranes dépend de la composition de celles-ci et des facteurs environnants. D'ailleurs, ce sont les différences dans la composition lipidique des souches bactériennes et dans l'environnement où elles se propagent qui expliquent la sélectivité et l'activité variables des PAMs^[161,162].

Les PAMs ont une action sélective sur les membranes microbiennes. Cette sélectivité est due aux différences entre les membranes cellulaires de l'hôte (animaux et plantes) et du pathogène (bactéries et champignons). Par exemple, les cellules de mammifères peuvent contenir jusqu'à 100 types différents de lipides et leurs membranes plasmiques

renferment majoritairement des phospholipides (neutres ou chargés négativement), mais également du cholestérol et des glycérolipides^[163]. Ces lipides sont distribués de façon asymétrique entre les feuillets interne et externe de la membrane, les lipides chargés négativement étant situés sur la face interne de la membrane alors que la couche externe est globalement neutre^[164]. Ceci explique le fait que les cellules mammifères sont épargnées par l'action (l'activité) des PAMs, contrairement aux cellules bactériennes. De plus, la présence du cholestérol dans les membranes des mammifères avec un effet condensant augmente leur densité et leur épaisseur et les rend moins susceptibles à l'action des PAMs^[9,135].



Current Biology

Figure 7. L'effet direct et indirect des peptides antimicrobiens (PAMs) sur les bactéries et l'hôte. Les PAMs peuvent agir en s'attachant à la membrane bactérienne par des liaisons électrostatiques. Ils exercent un effet direct en rupturant la membrane ou bien ils pénètrent en perturbant la fonction intracellulaire. Ceci peut mener à la lyse de la bactérie. Les PAMs peuvent aussi agir indirectement en modulant l'immunité de l'hôte. Ils jouent un rôle au niveau du recrutement des cellules immunitaires par chimiotaxie ou en influençant la reconnaissance des métabolites microbiens et des acides nucléiques libérés par les « Toll Like Receptor ». DC, cellule dendritique; LPS, lipopolysaccharide; LTA, acide lipoteichoïque; MAVS, protéine de signalisation antivirale mitochondriale. (Tirée de Zhang et al, 2016)^[144].

Ainsi, les peptides antimicrobiens ont des effets directs sur les membranes cellulaires des microorganismes, mais les PAMs peuvent aussi avoir des effets indirects en

modulant la réaction immunitaire de l'hôte (figure 7). En effet, ils agissent comme médiateurs de l'inflammation sur les cellules épithéliales ainsi que sur les cellules immunitaires comme les lymphocytes et les phagocytes. Leur effet immuno-modulateur est achevé par la diminution de la production des cytokines pro-inflammatoires ainsi que par la modulation de leur libération, influençant ainsi des processus tels que l'angiogenèse, la chimiotaxie ou la stimulation des cellules immunitaires. Il ne faut pas omettre le rôle essentiel des phagocytes et des lymphocytes des cellules eucaryotes dans la production des peptides antimicrobiens qui, à leur tour, influencent grandement le système immunitaire [9,144,165].

1.7.6 Expression et régulation des PAMs

Chez l'humain, des PAMs ont été identifiés dans la plupart des parties du corps normalement exposées aux microbes telles que la peau, la muqueuse intestinale, la muqueuse buccale, les poumons, les yeux et le tractus génito-urinaire. Certains PAMs sont exprimés de façon constitutive, mais la majorité est induite suite à une infection, une inflammation ou une lésion [9,144]. L'expression des PAMs est soumise à une régulation stricte, ce qui peut expliquer que, malgré qu'ils soient les produits de gènes anciens dans l'évolution, ils n'ont pas fait face à une résistance bactérienne.

De nombreux PAMs naturels sont synthétisés sous forme d'un long précurseur inactif, généralement stocké dans des granules de sécrétion, avec une séquence signal à l'extrémité N-terminale et le domaine antimicrobien à l'extrémité C-terminale. Le peptide actif est ensuite produit par clivage protéolytique. Par ailleurs, les PAMs subissent différents types de modifications post-traductionnelles telle que la phosphorylation, la méthylation, l'amidation, la glycosylation, l'addition d'acides aminés D et la formation de ponts disulfures [9,144].

L'épiderme et la muqueuse buccale chez les mammifères procurent une protection physique de la cavité buccale. De plus, elles produisent différentes molécules à activité antimicrobienne : molécules d'agglutination et d'adhésion bactériennes, chélateurs de métaux, peroxydases, inhibiteurs de protéases et des PAMs. En effet, un peu plus de 40 PAMs dont la majorité sont des PAMs cationiques sont exprimés dans la cavité buccale pour renforcer l'activité antimicrobienne des fluides buccaux. Par ailleurs,

plusieurs PAMs se trouvent dans la cavité buccale à des concentrations inférieures à la concentration inhibitrice minimale (CIM) déterminée expérimentalement, remettant ainsi en question leur activité antibactérienne réelle dans la cavité buccale. Néanmoins, des interactions synergétiques entre de nombreux PAMs a été démontrée et une activité antimicrobienne est observée même au deçà de la CIM des composants individuels [166-168].

1.7.7 Les histatines salivaires

Les histatines sont des PAMs cationiques produits par les cellules ductales de la parotide et des glandes sublinguales et sous-maxillaires [169,170]. Les histatines ont la propriété de s'adsorber sur l'hydroxyapatite de l'émail dentaire pour former la pellicule dentaire. Chez l'homme, l'histatine-1, -3 et -5 présentent une activité antifongique envers *C. albicans* et possèdent, par ailleurs, des propriétés antibactériennes et antivirales [171-173]. Étant des peptides cationiques, les histatines sont capables de se lier à la surface bactérienne et de provoquer la formation de canaux et de pores transmembranaires conduisant à la rupture de la membrane et éventuellement à la mort de la cellule bactérienne [174-176]. De plus, l'histatine-5 lie spécifiquement les métaux (divalents) tels que le zinc et le cuivre causant ainsi l'inhibition de certaines activités enzymatiques essentielles à la survie des microorganismes [177,178]. Il a également été montré que l'histatine-5 inhibe l'activité enzymatique de bactéries impliquées dans certaines pathologies parodontales, notamment *Porphyromonas gingivalis* et les *Bacteroides gingivalis* [172,173].

1.7.8 Résistance bactérienne aux PAMs

Il est actuellement reconnu qu'un seul PAM peut interagir avec plusieurs cibles cellulaires et que, inversement, plusieurs PAMs peuvent avoir la même cible. Cette particularité des PAMs est à l'origine de la résistance bactérienne limitée face aux PAMs [9]. Cependant, des études ont montré que certaines bactéries sont capables de résister aux PAMs en mettant en place différents mécanismes [179,180]. L'un des mécanismes est le clivage protéolytique des peptides. En effet, plusieurs protéases bactériennes ont été identifiées dont les gingipains secrétées par *P. gingivalis*, un pathogène buccal [181]. La substitution d'un ou de plusieurs acides aminés L par leurs

isomères D dans les PAMs augmente leur résistance à la dégradation protéolytique. C'est notamment le cas des peptides DJK-5, DJK-6, M33, and GL13K^[182–184].

Un autre mécanisme par lequel les bactéries résistent aux PAMs est la modification de la charge de leur surface. Par exemple, les cellules bactériennes peuvent réduire la charge négative de leur surface (membrane ou paroi) et limiter ainsi l'adhésion des peptides cationiques. Dans les bactéries Gram positifs, la D-alnylation des acides téichoïques et lipotéichoïques de la paroi leur procure une certaine résistance face aux PAMs^[161,179,185]. De la même façon, les bactéries Gram négatifs parviennent à diminuer la charge négative à leur surface par la réduction de la phosphorylation, la substitution des sucres ou l'addition de lipides au niveau des lipopolysaccharides de la membrane externe. Il semble que ce genre de modifications est à l'origine de la résistance de *P. gingivalis* aux PAMs^[186].

1.7.9 Développement de médicaments à base de peptides antimicrobiens

Le potentiel des PAMs en tant que nouveaux agents antimicrobiens, seuls ou en association avec les antibiotiques classiques, n'est pas à démontrer et l'intérêt pour le développement de médicaments à base de PAMs est grandissant^[187]. Leur utilisation comme régulateurs du système immunitaire, comme agents anti-LPS ou encore comme médicaments anticancéreux suscite aussi de l'intérêt^[188]. Cependant, les essais cliniques avec les PAMs sont relativement récents et peu de PAMs ont été approuvés par la FDA ; les formulations et les voies d'administration nécessitant encore d'être optimisées^[136,187]. En effet, peu de PAMs sont actuellement utilisés en clinique. C'est le cas de la polymyxine B (un lipopeptide obtenu de *Bacillus polymyxa*), la colistine (polymyxine E, également de *B. polymyxa*), la gramicidine (un polypeptide linéaire dérivé de *Bacillus brevis*), la daptomycine (un lipopeptide anionique cyclique)^[189]. L'attention est particulièrement portée au développement de médicaments à base de PAMs en tant qu'agents topiques, car l'utilisation systémique des PAMs est encore limitée par la toxicité, la dégradation et la clairance rénale rapides^[187]. Un certain nombre de PAMs font encore l'objet d'essais précliniques et cliniques. Par exemple, une formulation topique du peptide omiganan (CLS001, Cutanea Life Sciences) en gel 1% est actuellement en essai clinique phase III pour la prévention des infections

sanguines associées à l'utilisation des cathéters^[190]. L'omniganan s'est montré aussi efficace contre *Propionibacterium acnes* et pourrait être utilisé pour le traitement de l'acné vulgaire^[191]. Cependant, il est à remarquer que malgré les résultats prometteurs, de nombreux PAMs n'ont pas franchi les phases précliniques/cliniques. Un exemple marquant est celui du pexiganan (Locilex®), analogue synthétique de la magainine-2, destiné à être utilisé pour le traitement topique des infections associées au pied diabétique^[136]. Le pexiganan a échoué dans les essais cliniques phase III, malgré les résultats spectaculaires obtenus en phases cliniques I et II^[189,192].

Des peptides antimicrobiens à large spectre agissant sur des pathogènes oculaires bactériens ou viraux (HSV-1, adénovirus) sont aussi à l'étude pour le traitement de certaines infections oculaires^[193,194].

1.7.10 Le peptide KSL-W

Comme il vient d'être mentionné, les PAMs naturels, en plus de leur activité antimicrobienne, peuvent bien avoir d'autres fonctions qui sont actuellement plus ou moins définies et leur utilisation peut engendrer des complications biologiques. En outre, les PAMs naturels dont la production est déjà coûteuse sont souvent longs et susceptibles à la dégradation et au clivage enzymatique *in vivo*. Afin de pallier les limitations associées à l'utilisation de PAMs naturels, la synthèse de nouveaux peptides s'est imposée et les PAMs de synthèse (peptides biomimétiques ou PAMs conçus *de novo*) ont suscité un vif intérêt au cours des deux dernières décennies^[135]. Parmi les PAMs synthétiques figurent le WR2, le D-IK8 et le KSL et ses dérivés (KSL-M, KSL-W et KSL-D)^[195].

Testé dans des conditions buccales simulées *in vitro*, le décapeptide synthétique KSL-W (KKVFWVKFK) présentait une meilleure stabilité, comparée au peptide original KSL, tout en gardant ses propriétés antimicrobiennes^[195]. Par ailleurs, dans une étude réalisée sur une culture de cellules épithéliales gingivales humaines exposées à une infection au *C. albicans*, il a été montré que le peptide KSL-W n'avait pas d'effets cytotoxiques sur les cellules humaines alors qu'il inhibait la croissance et l'adhésion de la levure à l'épithélium de la muqueuse buccale. Il a également été montré qu'il

diminuait la virulence du *C. albicans* en modulant la réponse inflammatoire^[196]. Ultérieurement, utilisé à des concentrations non cytotoxiques de l'ordre de 100 µg/ml, le peptide KSL-W favorisait la croissance des fibroblastes gingivaux *in vitro*, leur différenciation en myofibroblastes et leur migration grâce à la production de l' α -actine. Ces effets contribuent au remodelage de la matrice extracellulaire autour de la blessure et sa guérison, ce qui suggère que le KSL-W pourrait jouer un rôle important dans la guérison des blessures au niveau de la gencive^[10].

Le KSL-W est connu pour ses effets inhibiteurs sur la croissance des espèces bactériennes associées aux lésions carieuses et à la formation de plaques^[197]. Alors, une étude a été réalisée afin d'évaluer si le KSL-W peut être utilisé dans des gommages à mâcher comme agent pour contrer la formation des plaques dentaires et les résultats obtenus étaient concluants et ont montré que le KSL-W possède les caractéristiques de stabilité, d'adsorption et de libération nécessaires à l'administration locale dans la cavité buccale^[198,199]. De plus, il a été montré que le KSL-W, utilisé aux doses antibactériennes, n'avait pas d'effets cytotoxiques sur les ostéoblastes *in vitro*, démontrant encore son potentiel en tant qu'agent antibactérien contre les infections buccales telles que les parodontites^[200].

1.7.11 Perspectives d'un agent endodontique

De nombreuses études se sont penchées sur l'effet des peptides antimicrobiens sur le microbiote endodontique^[201]. En effet, il a été montré qu'une panoplie de peptides antimicrobiens possède une excellente activité antimicrobienne contre le microbiote endodontique avec une faible concentration inhibitrice en plus d'un effet inhibiteur sur la résorption osseuse^[201]. À titre d'exemple, le peptide antimicrobien LL-37 induisait la migration des cellules de la pulpe dentaire (humaine) et pourrait contribuer à la régénération des structures du complexe pulpe- dentine^[202]. En outre, il a été observé que le LL37 et les β - défensines possédaient une activité antimicrobienne contre certaines bactéries cariogènes et parodontopathogènes^[203]. Également, des peptides synthétiques tels que VSL et VS2 présentaient une activité importante contre *E. faecalis*, *Staphylococcus aureus* et *C. albicans*, des pathogènes impliqués dans les infections endodontiques^[204].

1.8 Mise en contexte

Les dents peuvent être affectées par plusieurs pathologies, dont celles qui peuvent affecter la pulpe dentaire. Plusieurs traitements sont ainsi recommandés dépendamment du niveau de l'inflammation ou de l'infection de la pulpe. Parmi les traitements des dents immatures nécrosées en endodontie, la revascularisation est une technique qui permet l'induction de la croissance des racines non complètement formées et la régénération du complexe pulpe- dentine. Ce type de traitement nécessite l'utilisation de molécules antimicrobiennes telle que l'antibiothérapie locale et le $\text{Ca}(\text{OH})_2$. Ces agents peuvent avoir un certain degré de cytotoxicité sur les cellules présentes dans la structure pulpaire. De là l'intérêt d'étudier l'effet du peptide antimicrobien KSL-W sur les cellules souches pulpaires comme une nouvelle approche de traitement antimicrobien.

1.9 Objectifs de recherche

1.9.1 Hypothèse

Le peptide antimicrobien KSL-W pourrait être moins toxique pour les cellules souches pulpaire que les mélanges d'antibiotiques utilisés lors de traitement endodontique.

1.9.2 Objectifs

1. Évaluer l'effet du triple antibiotique (Ciprofloxacine, Métronidazole et minocycline; 1 :1 :1), du double antibiotique (Ciprofloxacine et Métronidazole; 1 :1) et du KSL-W sur l'adhésion des cellules souches pulpaire.
2. Étudier l'effet du triple antibiotique (Ciprofloxacine, Métronidazole et minocycline; 1 :1 :1), du double antibiotique (Ciprofloxacine et Métronidazole; 1 :1) et du KSL-W sur la viabilité et l'activité métabolique des cellules souches pulpaire.
3. Évaluer l'effet du triple antibiotique (Ciprofloxacine, Métronidazole et minocycline; 1 :1 :1), du double antibiotique (Ciprofloxacine et Métronidazole; 1 :1) et du KSL-W sur la migration des cellules souches pulpaire après une blessure, *in vitro*.

1.9.3 Pertinence du projet

En endodontie, l'élimination de l'infection microbienne du système canalaire est une condition nécessaire de la réussite des traitements des canaux et de la régénération tissulaire au niveau de la dent. Les agents endodontiques présentement utilisés ont certaines limitations comme une cytotoxicité au niveau des cellules souches de la pulpe ou un effet antimicrobien limité. Le peptide KSL-W semble être efficace comme traitement antifongique ou, a montré une efficacité contre certaines souches pathogènes orales. De plus, le peptide KSL-W favorise la migration et la croissance des fibroblastes, stimulant ainsi la guérison de la blessure au niveau de la gencive ^[10,195,196].

Nous avons procédé à l'étude de l'effet de molécules antimicrobiennes, dont le triple antibiotique (Ciprofloxacine, Métronidazole et minocycline; 1 :1 :1), le double antibiotique (Ciprofloxacine et Métronidazole; 1 :1) et le KSL-W sur les cellules souches pulpaire. Notre hypothèse est la suivante: étant donné que les antibiotiques et

l'hydroxyde de calcium possèdent une cytotoxicité au niveau des cellules souches de la pulpe, le peptide KSL-W pourrait les remplacer comme agent endodontique. En effet, nous estimons que le peptide KSL-W à des concentrations de 50 et 100 µg/ml pourrait jouer un rôle important dans la guérison de la pulpe et la régénération de certaines structures de la dent, tout en étant biocompatible et ayant une cytotoxicité négligeable.

Le peptide KSL-W pourrait être utilisé comme agent endodontique sous forme de pâte pour la régénération tissulaire, mais aussi comme agent antimicrobien sous forme d'une solution d'irrigation pour le traitement des canaux. Il pourrait également être combiné à d'autres agents endodontiques tels que le MTA pour ajouter un effet antimicrobien.

2 Démarche de recherche proposée

2.1 Origine des cellules souches pulpaire

Les cellules souches pulpaire ont été obtenues à partir de dents de sagesse humaines extraites chez des patients adultes âgés de 18 à 25 ans, après leurs consentements. Il est à noter que la recherche n'a commencé qu'après évaluation et approbation du protocole par le Comité d'éthique de l'Université Laval. Les tissus pulpaire ont été extraits avec des limes endodontiques. Ensuite, les tissus ont été digérés par une solution de collagénase de type I (3 mg/ml) pendant 1 heure à 37 °C. Les cellules extraites ont été cultivées dans un milieu de culture DMEH supplémenté de 10% de sérum de veau foetal. La caractérisation des cellules a été réalisée aux passages 4-5 en utilisant des anticorps spécifiques (CD73, CD90, CD105, CD34, CD45, CD11b et CD19 et l'antigène leucocytaire humain de classe II) [205].

2.2 Description de l'antibiothérapie locale

Les agents endodontiques antimicrobiens utilisés dans cette recherche consistaient de la pâte du triple antibiotique contenant le métronidazole, la ciprofloxacine et la minocycline dans un rapport 1:1:1; la pâte double antibiotique contenant du métronidazole et de la ciprofloxacine dans un rapport de 1:1. Ces molécules ont été obtenues en mélangeant 1 000 mg de chaque combinaison de médicaments dans 1 ml d'eau. Ensuite les concentrations étudiées le long de ce projet variant de 1 mg/ml à 0,125 mg/ml.

2.3 Description du KSL-W

La synthèse du peptide antimicrobien KSL-W a été réalisée par des procédés en phase solide standard avec la 9-fluorénylméthoxycarbonyle dans un appareil synthétiseur de peptides. Par la suite, les peptides synthétisés ont été purifiés par chromatographie en phase liquide à haute performance [206]. Une solution de KSL-W a été préparée et stérilisée par filtration à travers un filtre à 0,22 µm [10]. L'évaluation de l'adhésion, de la

prolifération et de la migration des cellules souches pulpaire a été en présence de différentes concentrations du peptide antimicrobien KSL-W (10, 50 et 100 µg/ml).

2.4 Évaluation des effets du KSL-W et des antibiotiques sur l'adhésion des cellules souches pulpaire

Pour évaluer les effets des antibiotiques et du KSL-W sur l'adhésion cellulaire, des cellules souches pulpaire humaine ont été utilisées. Ces cellules ont été cultivées dans un milieu spécifique [Dulbecco's modified Eagle's (DME)-Ham's (3:1) medium (DMEH)] complété avec de la transferrine humaine (5 µg/ml), du 3,3,5-triiodo-L-thyronine (2×10^{-9} M), d'hydrocortisone (0,4 µg/ml), du facteur de croissance épithélial (10 ng/ml), de la pénicilline G (100 IU/ml), et du sérum de veau fœtal (10%). Ensuite, les cellules ont été détachées à l'aide d'une solution de trypsine (0,05%), puis le nombre des cellules vivante a été déterminé en utilisant un test de bleu trypan (0,4%)^[10]. Les cellules ont été réensemencées dans des plaques de 6 puits (10⁵ cellules par puits) en présence ou non de différentes concentrations de mélanges des triples ou de doubles antibiotiques aux concentrations suivantes : 1mg/ml, 0,5 mg/ml, 0,25 mg/ml et 0,125 mg/ml. Un contrôle sans antibiotiques a été préparé en parallèle. Voici un exemple des plaques de 6 puits avec différentes concentrations (figures 8).

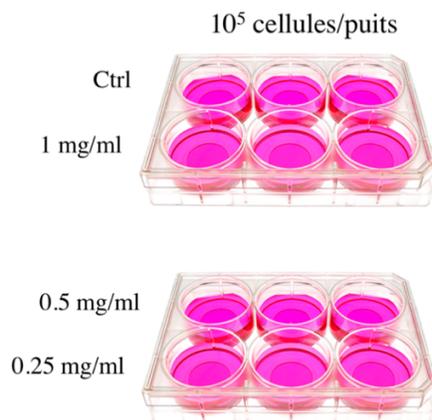


Figure 8. Schéma expérimental pour évaluer les effets des antibiotiques et du KSL-W sur l'adhésion cellulaires.

Les mêmes étapes ont été réalisées avec le peptide antimicrobiens KSL-W aux concentrations de 10, 50 et 100 µg/ml. L'évaluation de l'adhésion a été réalisée à 8 et à 24 heures, après la culture. Les cellules ont été fixées au paraformaldéhyde 4 % pendant 24h, lavées avec un tampon phosphate PBS puis colorées avec une solution de cristal violet, pendant 10 min. Les puits ont été ensuite lavés avec de l'eau distillée à plusieurs reprises et les plaques ont été séchées puis observées à l'aide d'un microscope inversé^[10]. Les photos ont été prises à différents sites de chaque culture afin de quantifier le nombre de cellules adhérentes, et d'évaluer la morphologie cellulaire.

2.5 Évaluation de l'effet des antibiotiques et du KSL-W sur la viabilité/l'activité métabolique des cellules souches pulpaire

La prolifération des cellules souches pulpaire a été évaluée par le test MTT [bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl) -2,5-diphényl tétrazolium]. Dans des plaques de 6 puits, les cellules souches pulpaire (10^5 par puits) ont étéensemencées dans un milieu DMEH en présence de mélange d'antibiotiques ; le double (métronidazole et ciprofloxacine 1:1) ou le triple antibiotique (Ciprofloxacine, Métronidazole et minocycline; 1 :1 :1), à des concentrations de 1 mg/ml, 0,5 mg/ml, 0,25 mg/ml et 0,12 mg/ml. Les mêmes étapes ont eu lieu avec le peptide antimicrobiens KSL-W aux concentrations de 10, 50 et 100 µg/ml (figure 9). Après une incubation de 48h en présence ou non des antibiotiques ou du KSL-W, chaque culture a été supplémentée d'une solution de MTT, puis incubée pendant 4 heures à 37 °C^[207].

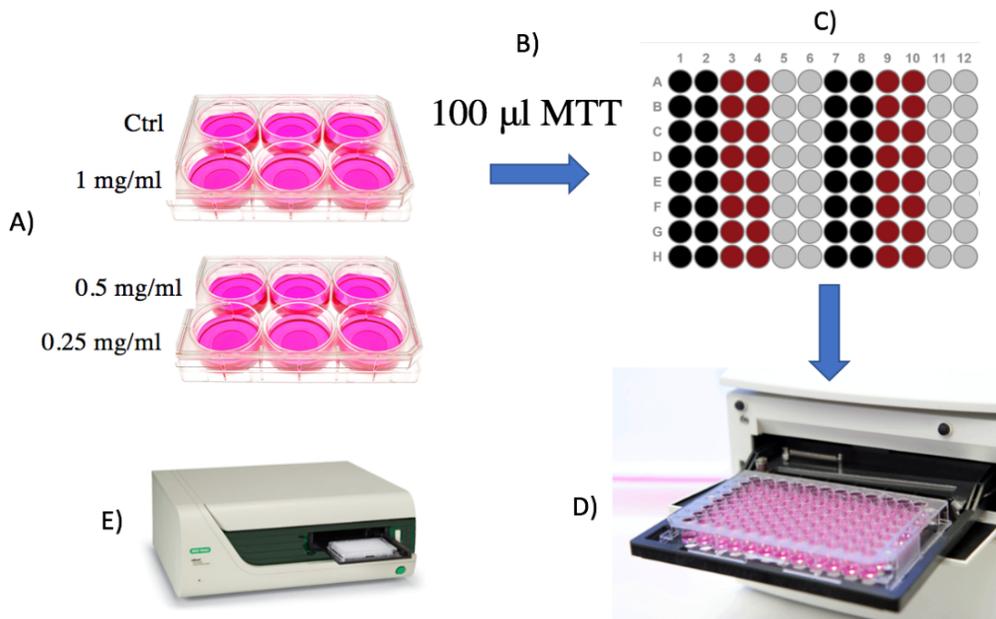


Figure 9. Schéma expérimental montrant les différentes étapes d'évaluation de l'effet des antibiotiques et du KSL-W sur la viabilité/l'activité métabolique (V/AM) des cellules.

Par la suite, le milieu de culture contenant l'excédent de MTT a été enlevé, puis les cellules ont été mises en contact avec 1 ml d'une solution d'isopropanol-HCl 0,04 N a été ajouté à chaque puits et laissé agir pendant 15 minutes dans l'obscurité en utilisant une plaque agitatrice. Les cellules lysées libèrent le formazan qui s'est formé dans les mitochondries des cellules souches pulpaire vivantes. La solution obtenue a été transférée dans une plaque de 96 puits et l'absorbance a été déterminée pour chaque puits à 550 nm à l'aide du spectrophotomètre ^[196].

2.6 Évaluation de l'effet des antibiotiques et du KSL-W sur la migration des cellules souches pulpaire en cas de blessure

L'évaluation de la capacité migratoire des cellules souches pulpaire a été évaluée à l'aide d'un test de blessure « in vitro scratch ». Ce test consiste à créer une blessure dans une culture confluente de cellules en monocouche. Ensuite, des photos sont prises au début et à des intervalles réguliers pendant la période de culture des cellules ^[208].

Pour évaluer l'effet des antibiotiques et du KSL-W sur la capacité migratoire des cellules souches pulpaire, nous avonsensemencé, dans des plaques de 6 puits, les cellules souches pulpaire que nous avons maintenues en culture jusqu'à une confluence de 100%. Ensuite, une blessure en forme de croix a été réalisée dans la couche cellulaire uniforme à l'aide d'un embout d'une micropipette de 20 µl. Suite à cette blessure, les solutions d'antibiotiques (TAP ou DAP) ont été ajoutées dans les puits avec des concentrations de 1 ; 0,5 ; 0,25 et 0,125 mg/ml. Un contrôle sans antibiotiques a été préparé en parallèle. Des photos ont été prises aux temps zéro, 12 heures et 24 heures après le traitement. Les cultures ont été maintenues à 37°C [208].

La même expérience a été réalisée avec le peptide antimicrobien KSL-W (50 et 100 µg/ml). Toutes les expériences ont été réalisées en triplicata pour les pâtes du triples et doubles antibiotiques (1; 0,5; 0,25 et 0,12 mg/ml) ainsi que pour le peptide antimicrobien KSL-W aux concentrations de 10, 50 et 100 µg/ml.

2.7 Analyses statistiques

Les résultats ont été exprimés en moyenne \pm écart-type. Les données ont été analysées statistiquement avec le test ANOVA (analyse de la variance avec un facteur unique) en utilisant le logiciel SAS Statview 5.0. Les résultats ont été considérés statistiquement significatifs lorsque $p < 0,05$.

3 Résultats

3.1 Comparaison de l'effet du double et du triple antibiotique avec celui du peptide KSL-W sur l'adhésion des cellules souches pulpaire

Les cellules ont été mises en culture en présence ou non d'antibiotiques (DAP ou TAP) ou de peptide KSL-W à différentes concentrations. L'adhésion cellulaire a été évaluée après 8 et 24 heures de culture à l'aide d'une coloration au cristal violet suivi d'une analyse microscopique. La figure 10 montre qu'après 8 heures, la pâte du double antibiotique (DAP) a des effets cytotoxiques significatifs sur l'adhésion des DPSC à toutes les concentrations utilisées (1mg/ml, 0,5 mg/ml, 0,25 mg/ml et 0,125 mg/ml). Les cellules souches dans le groupe contrôle adhèrent d'une manière adéquate et prennent une forme allongée. Cependant, dans le groupe de 0,125 mg/ml d'ATB, les cellules montrent aussi une forme fusiforme, mais plus rétrécie et le nombre est beaucoup moins important. Par contre, dans les groupes 0,25 mg/ml et 1mg/ml ; très peu de cellules ont adhéré, et leur morphologie montre des cellules rétrécies. En effet, aucune cellule n'a adhéré à la surface de culture en présence d'une concentration de 1 mg/ml de DAP. Contrairement aux antibiotiques, les cellules en présence de KSL-W semblent en très bon état. La figure 11, montre qu'après 8 heures en présence du peptide KSL-W, les cellules ont adhéré, et montrent une morphologie comparable au groupe contrôle (cellules non traitées). Une analyse quantitative par dénombrement cellulaire (figures 12 et 13) confirme nos observations microscopiques. En effet, ces analyses quantitatives montrent qu'après 8 h et 24 h, les traitements à base de double et triple antibiotiques ont des effets délétères significatifs et doses dépendantes sur l'adhésion cellulaire. Alors que les cellules en contact du peptide KSL-W adhèrent adéquatement dans leurs environnements, d'une manière semblable aux groupes contrôles.

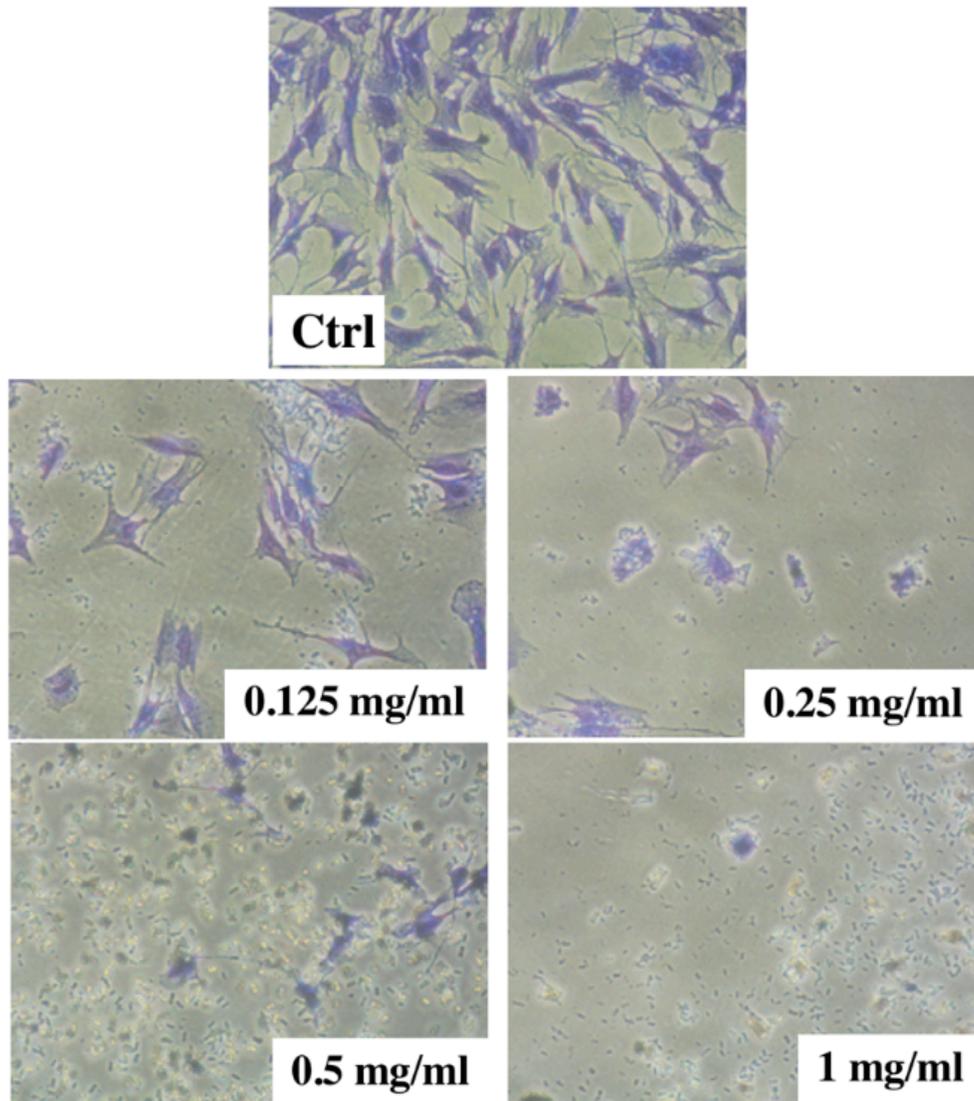


Figure 10. Analyse microscopique de l'effet du double antibiotique sur les DPSC. Les cellules ont été mises en culture en présence de DAP à différentes concentrations. L'adhésion et la morphologie cellulaire ont été évaluées après 8 h de culture, à l'aide d'une coloration au cristal violet, d'observations microscopiques et de photographies.

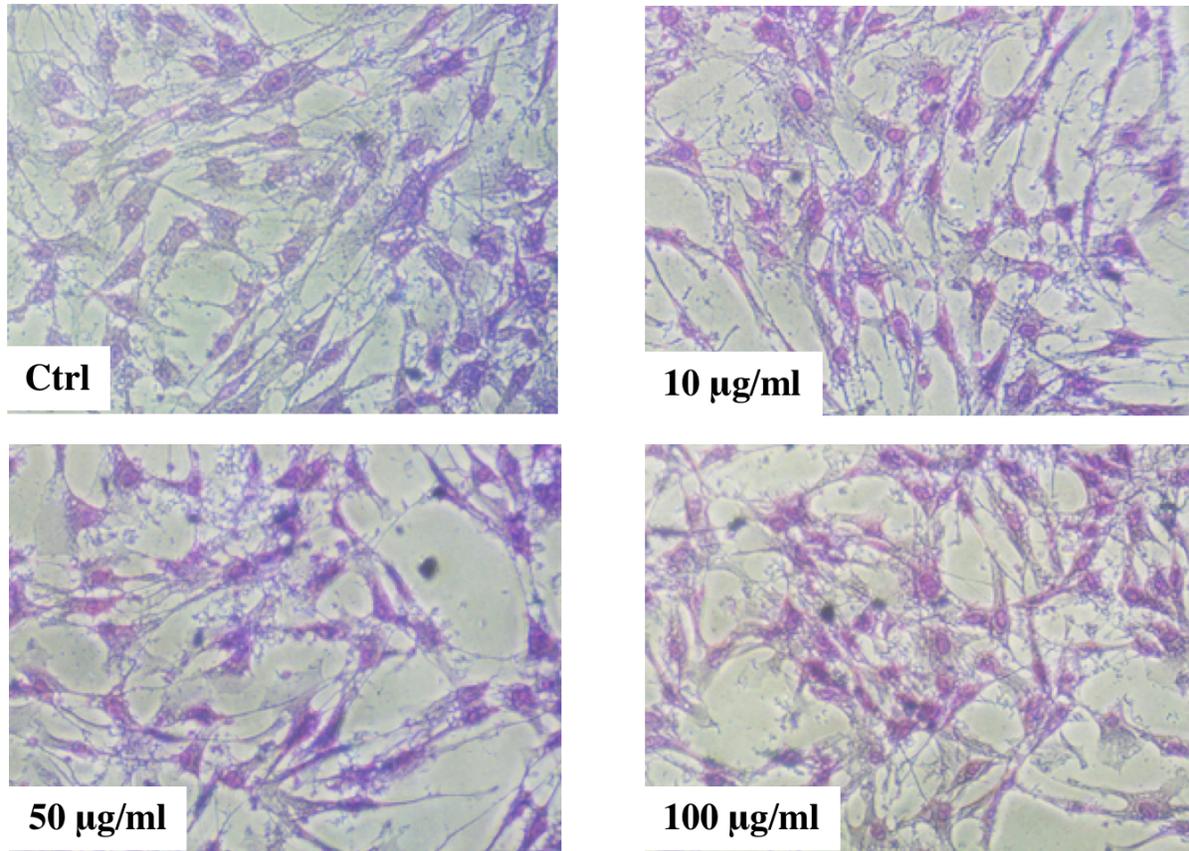


Figure 11. Analyse microscopique de l'effet du peptide KSL-W sur les cellules souches de la pulpe dentaire. Les cellules ont été mises en culture en contact avec le peptide antimicrobien KSL-W à différentes concentrations. L'adhésion et la morphologie cellulaire ont été évaluées après 8 h de culture, à l'aide d'une coloration au cristal violet, puis observation en microscopie optique.

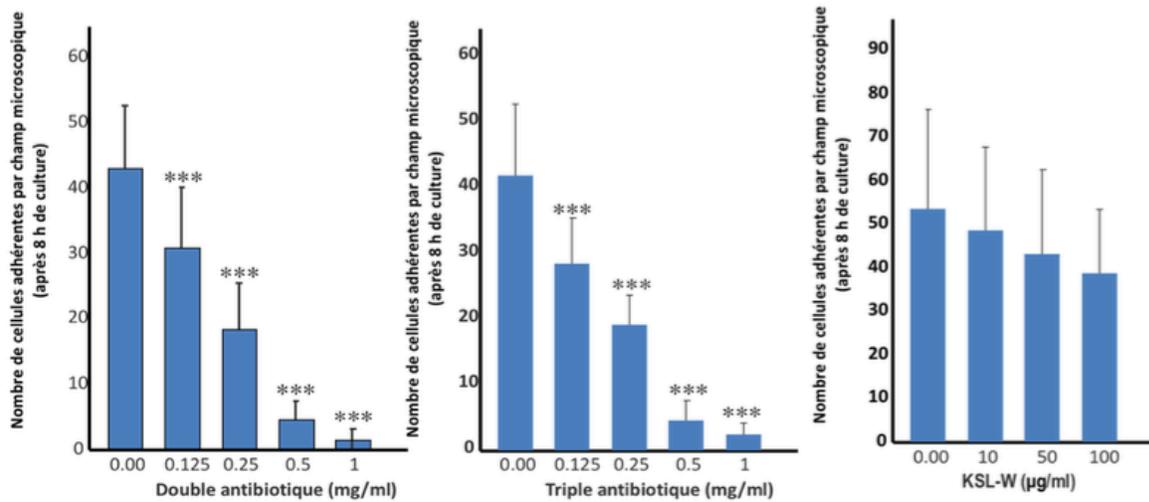


Figure 12. Évaluation quantitative de l'effet des molécules (double et triple antibiotiques, KSL-W) sur l'adhésion des DPSC après 8 heures. Les cellules ont été mises en culture en présence de DAP/TAP et peptide KSL-W à différentes concentrations, pendant 8 h. Après cette incubation, les cellules ont été marquées au Crystal violet, observées au microscope optique inversé, photographiées puis comptées. La moyenne \pm l'écart type de 3 expériences indépendantes est présenté. Le symbole *** signifie que $P \leq 0,001$.

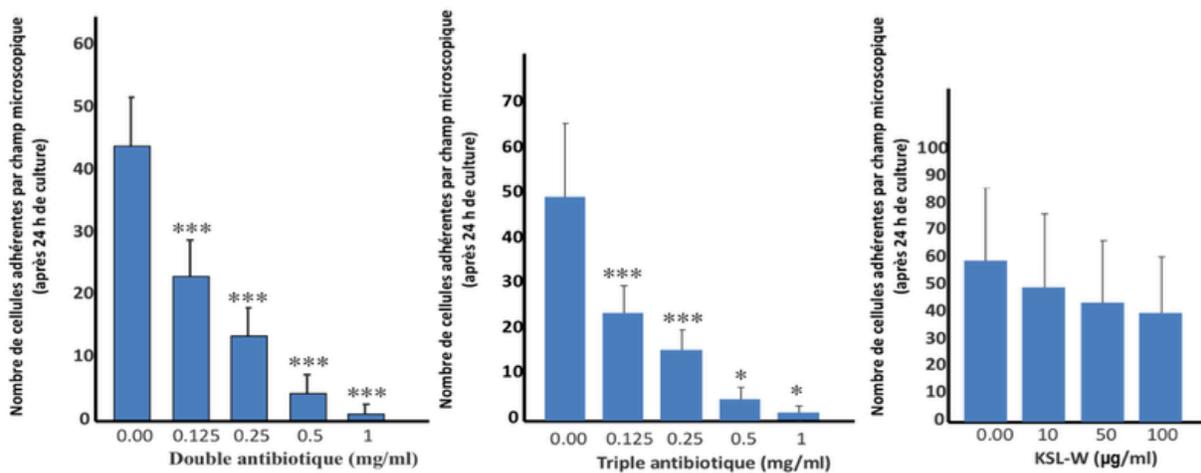


Figure 13. Évaluation quantitative de l'effet des molécules (double et triple antibiotiques, KSL-W) sur l'adhésion des DPSC après 24 heures. Les cellules ont été mises en culture en présence de différentes molécules antimicrobiennes (DAP/TAP et peptide KSL-W) à différentes concentrations, pendant 24 h. Après cette incubation, les DPSC ont été marquées au Crystal violet, analysées au microscope optique inversé et photographiées. Un comptage a eu lieu et la moyenne \pm l'écart type de 3 expériences indépendantes a été calculé. Le symbole *** signifie que $P \leq 0,001$.

3.2 Évaluation de la viabilité/activité métabolique des DPSC après 48h

Le taux d'activité métabolique des cellules souches de la pulpe dentaire en présence des différentes molécules antimicrobiennes (DAP/TAP et peptides KSL-W) a été évalué à l'aide du test MTT. Les antibiotiques (DAP et TAP) ont été utilisés avec des concentrations qui varient de 0,125 mg/ml à 0,5 mg/ml. Le peptide KSL-W a été utilisé avec les concentrations suivantes : 10, 50 et 100 µg/ml.

La figure 14 montre que les différentes concentrations des solutions des doubles et triples antibiotiques : 0,5 mg/ml, 0,25 mg/ml et 0,125 mg/ml ont des effets cytotoxiques significatifs sur la viabilité/prolifération des DPSC comparativement aux contrôles (cellules non-traitées). En effet, l'absorbance, qui dépend étroitement du nombre de cellules vivantes dans une culture, passe de $1,56 \pm 0,512$, avec le contrôle à $0,31 \pm 0,15$ avec une concentration de 0,5 mg/ml du double antibiotiques. À propos du triple antibiotiques, l'absorbance passe de $0,87 \pm 0,21$, avec le contrôle à $0,18 \pm 0,09$ avec une concentration de 0,5 mg/ml.

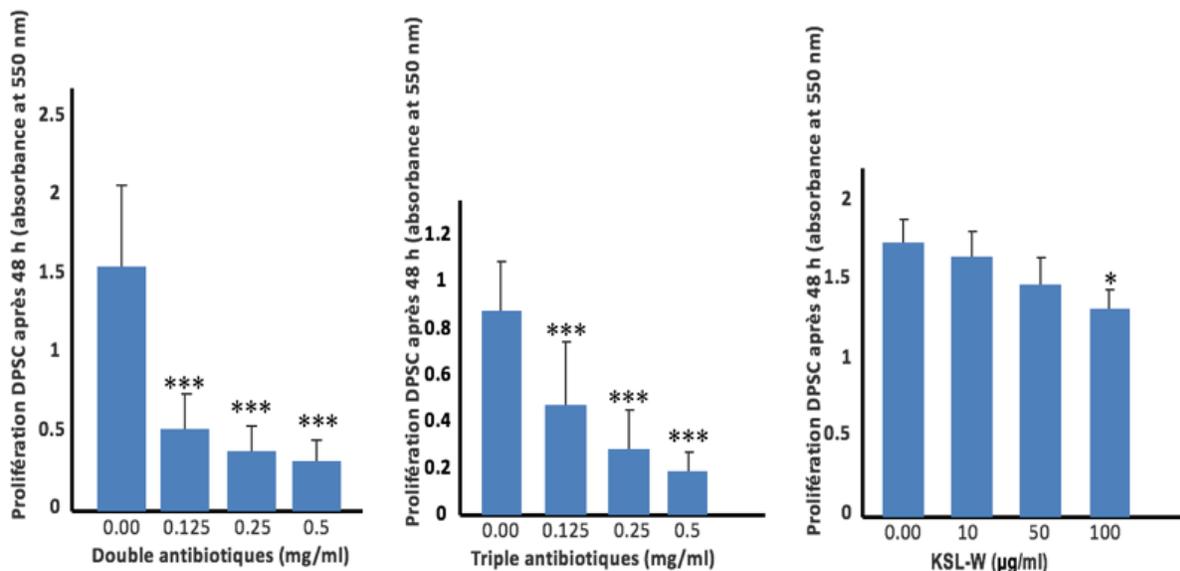


Figure 14. Évaluation quantitative de l'effet des antibiotiques locaux (DAP ou TAP) et du peptide KSL-W sur le taux de viabilité et d'activité métabolique des DPSC. Les cellules ont été mises en culture en présence des doubles et triples antibiotiques ou du peptide KSL-W à différentes concentrations. Après cette incubation, les DPSC ont été marquées avec le MTT et l'absorbance a été mesurée à 550 nm à l'aide du spectrophotomètre. Note : * signifie que $P \leq 0,05$ et *** indique que $P \leq 0,001$.

Cependant, la viabilité/activité métabolique des cellules souches pulpaire ne semble pas être affectée par le KSL-W surtout à faibles concentrations. En effet, l'absorbance passe de $1,74 \pm 0,16$ avec le contrôle à $1,65 \pm 0,17$ avec la concentration de $10 \mu\text{g/ml}$ de KSLW, et à $1,47 \pm 0,19$ avec la concentration de $50 \mu\text{g/ml}$. Il est important de noter qu'à la concentration de $100 \mu\text{g/ml}$ de KSL-W, la viabilité/prolifération des cellules semble diminuée (figure 14). Cependant, cette diminution n'est pas significative lorsqu'elle est comparée au contrôle.

3.3 Évaluation de l'effet des doubles et triples antibiotiques ou le KSL-W sur la migration des DPSC

La migration des cellules souches humaines de la pulpe dentaire en présence de différentes molécules antimicrobiennes (DAP, TAP et peptides antimicrobiens KSL-W) a été évaluée à l'aide de l'expérience du *scratch test in vitro*, puis la migration cellulaire a été suivie à l'aide d'observations microscopiques à différents temps. La figure 15 montre qu'après 24 heures, les DPSC en contact avec le DAP à une concentration de $0,5 \text{ mg/ml}$ sont incapables de migrer et fermer le site de blessure. Cependant, les cellules souches en contact avec le peptide antimicrobien KSL-W à une concentration de $100 \mu\text{g/ml}$ sont capables de migrer d'une manière adéquate, pour couvrir complètement la blessure créée sur la culture avant le traitement.

Dans les figures 16 et 17, les cellules souches en présence des antibiotiques (DAP et TAP) aux concentrations de $0,125$ à $0,5 \text{ mg/ml}$ migrent beaucoup moins rapidement que le groupe contrôle après 8 et 24 heures. Les DPSC en contact avec les antibiotiques (DAP et TAP) à une faible concentration ($0,125 \text{ mg/ml}$) ont tendance à se rapprocher du groupe contrôle après 24 heures. Cependant, en présence du peptide KSL-W, les DPSC ont un taux de migration comparable à celui du groupe contrôle après 12 et 24 heures; et ceci est vrai pour toutes les concentrations testées (10 , 50 , et $100 \mu\text{g/ml}$). Ainsi, les solutions des antibiotiques (DAP et TAP) ont des effets cytotoxiques sur la migration des DPSC ; ce qui n'est pas le cas avec le peptide antimicrobien KSL-W.

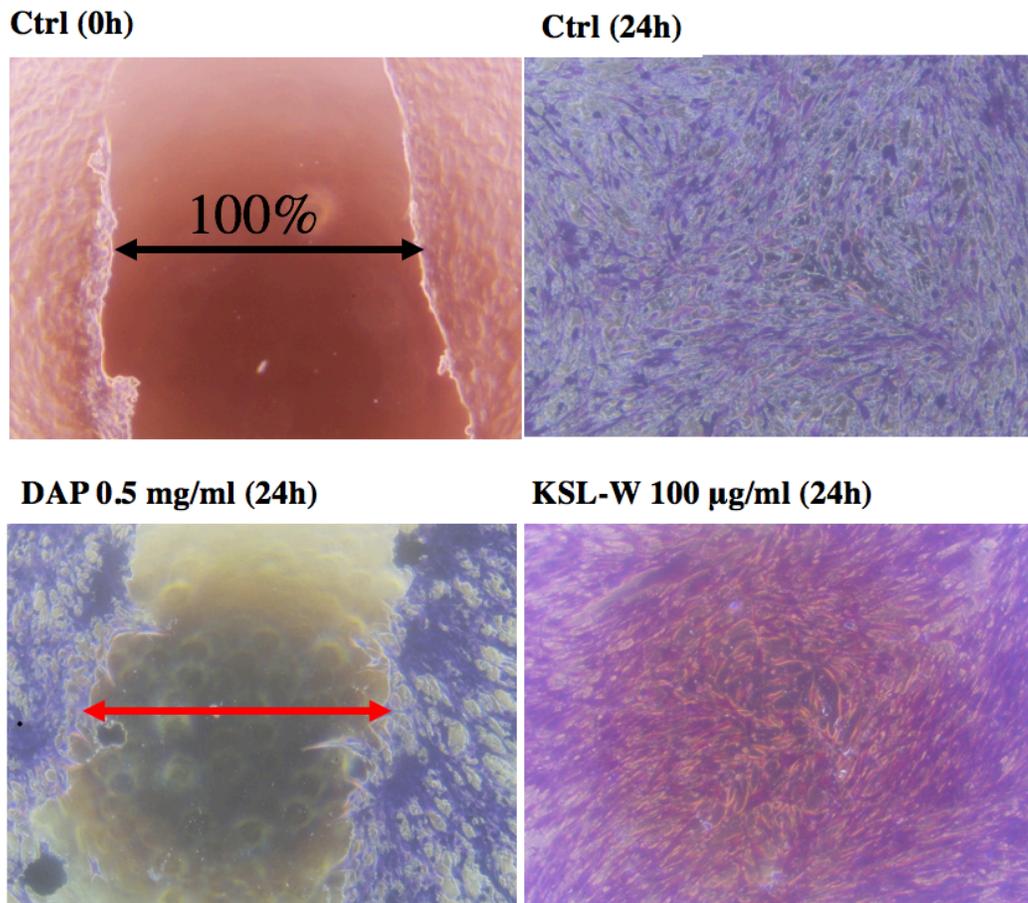


Figure 15. Analyse microscopique de l'effet des antibiotiques locaux (double et triple) et du peptide KSL-W sur le taux de migration des cellules souches pulpaire. Les cellules ont été cultivées jusqu'à confluence puis une blessure a été réalisées sur chaque culture avant le début de traitement aux antibiotiques ou au KSL-W. Le suivi de la migration cellulaire s'est fait à différents temps.

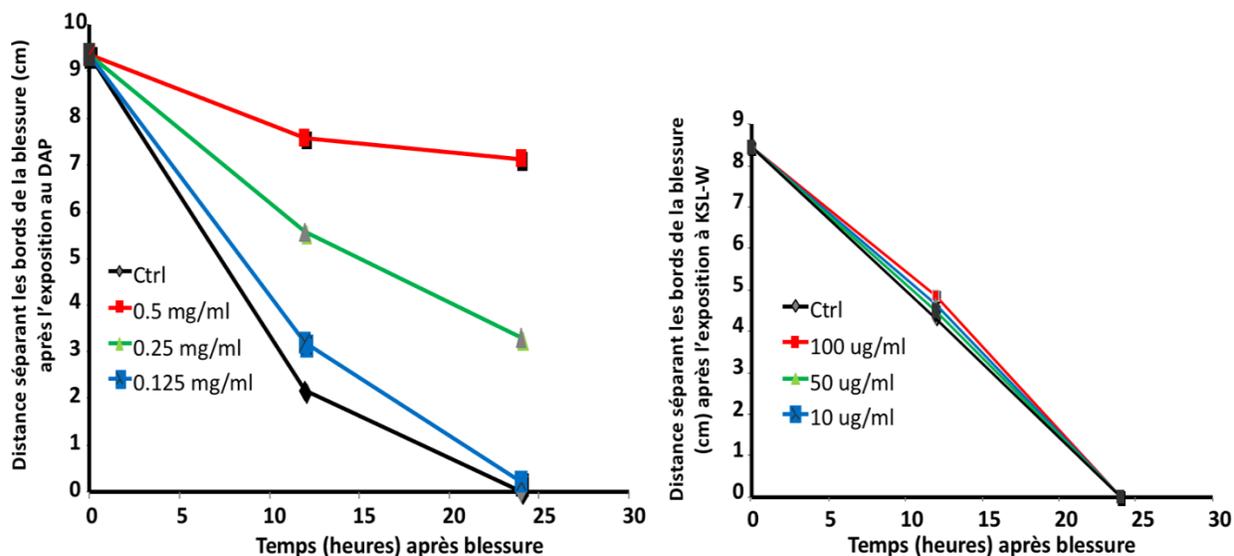


Figure 16. L'effet des molécules (double antibiotique et peptide KSL-W) sur la migration des cellules souches pulpaire. Les cellules souches ont été cultivées jusqu'à l'obtention d'une monocouche cellulaire confluente. Ensuite, une blessure a été réalisée sur chaque culture avant le début de traitement aux pâtes des antibiotiques (DAP et TAP) ou au KSL-W. Le suivi de la migration cellulaire s'est fait après 8 heures et 24 heures.

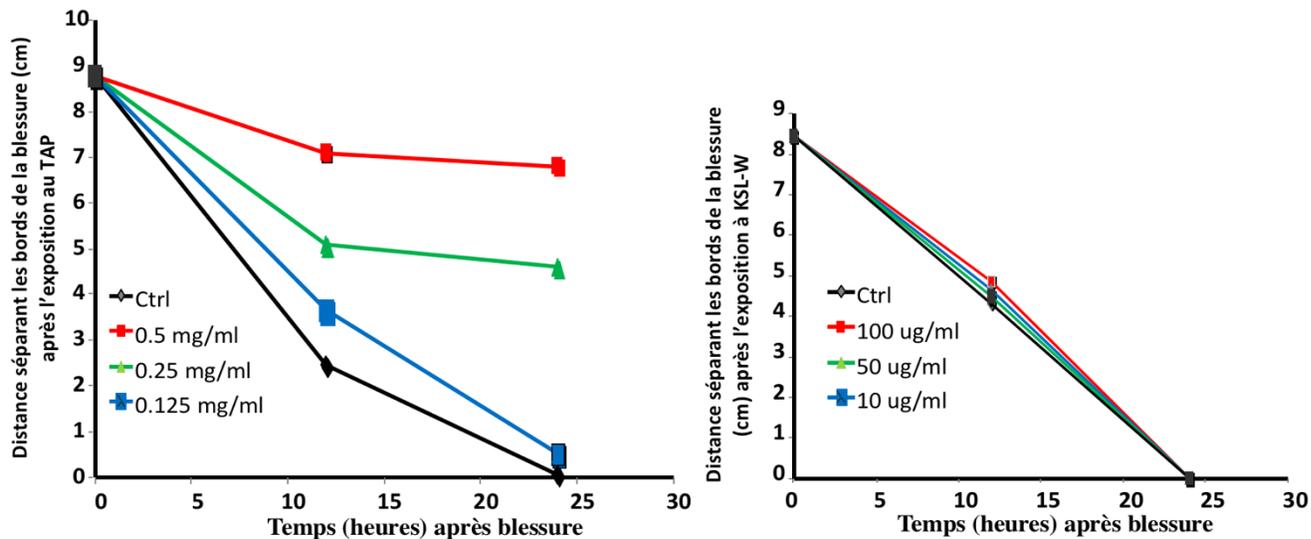


Figure 17. L'effet des triples antibiotiques et du peptide antimicrobien KSL-W sur la migration des cellules souches pulpaire. Les DPSC ont été cultivées jusqu'à confluence. Après, une blessure a été réalisée sur chaque culture cellulaire avant d'ajouter les différents agents antimicrobiens étudiés (DAP/TAP et le peptide KSL-W). Le suivi de la migration cellulaire s'est fait à différents moments.

4 Discussion

L'être humain partage l'environnement dans lequel il vit avec de nombreux microorganismes dont des bactéries, des virus, des levures et des protozoaires. Ces microorganismes peuvent être la source de diverses maladies infectieuses face auxquelles l'Homme a développé différents médicaments tels que les antibiotiques, les antiviraux et les antifongiques. C'est alors que ces médicaments, particulièrement les antibiotiques, sont devenus d'usage répandu et commun, voire universel.

La surprescription des antibiotiques par les professionnels de la santé pour la gestion des infections dentaires est problématique. L'impact des dentistes dans l'émergence de la résistante microbienne est important étant donné qu'ils prescrivent environ 10% de tous les antibiotiques couramment utilisés^[209]. Dans ce contexte, il est essentiel de comprendre l'importance du microbiote oral et de l'utilisation des antibiotiques pour traiter les infections buccales et dentaires. En effet, d'une part, les infections d'origine dentaire (y compris les infections endodontiques) sont de nature polymicrobienne et d'autre part, la prescription des antibiotiques est empirique dans la plupart des cas^[210,211]. Ainsi, il n'est pas possible d'ignorer l'utilisation croissante des antibiotiques à large spectre dans les cas où ceux-ci ne sont pas indiqués. Prenons comme exemple la pulpite irréversible symptomatique, les pulpes nécrotiques et les abcès apicaux aigus localisés^[212].

Il est important de rappeler que, selon les lignes directrices de *l'American Association of Endodontists*, l'utilisation des antibiotiques systémiques n'est pas indiquée dans les cas d'abcès localisé^[213]. Dans ces cas précisément, il faut chercher à effectuer un drainage sans utilisation d'antibiotiques. L'utilisation d'antibiotiques systémiques devient utile dans les cas d'abcès apicaux aigus avec atteinte systémique et des infections progressives et persistantes^[214].

Par ailleurs, l'efficacité des antibiotiques repose sur l'atteinte de la concentration minimale inhibitrice (CMI) du médicament contre les micro-organismes ciblés au niveau du site de l'infection. Or, dans le cas d'une dent cariée, le tissu pulpaire devient nécrosé et non

vascularisé et, par conséquent, les antibiotiques administrés per os ne peuvent pas atteindre le site de l'infection. De plus, en cas d'une infection endodontique, la présence de pus limite l'apport vasculaire, sans oublier les débris cellulaires et les protéines capables de lier et de séquestrer les molécules d'antibiotiques. Tous ces facteurs limitent l'efficacité des antibiotiques et rendent nécessaire de pratiquer un drainage adéquat^[213,215].

Il faut reconnaître que l'antibiothérapie systémique s'est révélée utile, voire même nécessaire dans certaines interventions chirurgicales et non chirurgicales dans le domaine dentaire. Cependant, l'administration systémique des antibiotiques donne lieu à des effets non désirables tels que la sélection de souches microbiennes résistantes, des réactions allergiques, une possible toxicité sur les cellules humaines. Il existe d'autres facteurs qu'il faut prendre en considération dont l'observance du patient, l'absorption par le système gastro-intestinal et le transport de l'antibiotique par le système sanguin jusqu'à la zone infectée. Ainsi, il devient clair qu'un apport sanguin adéquat n'est pas possible pour les dents avec pulpes nécrotiques ou les dents obturées. Par conséquent, l'application locale d'antibiotiques au niveau du canal d'une dent infectée peut représenter une voie d'administration plus efficace que l'administration systémique^[108].

L'approche de l'administration topique d'antibiotiques dans le système canalaire infecté est ingénieuse. Cette méthode devrait être privilégiée, car le médicament est appliqué au site même et y est plus efficace. Ainsi, la concentration bactéricide peut être atteinte et maintenue pendant une période appropriée. En effet, le début de l'action de l'antibiotique est rapide puisqu'il n'y a pas de temps de latence pour l'arrivée du médicament au site de l'infection. De plus, l'utilisation d'antibiotiques intra-canalaire ne nécessite pas un suivi de la posologie de la part du patient et réduit ainsi les risques de développer des complications telles que les allergies, la toxicité, le développement de résistance et les infections à levures^[216]. Compte tenu de la nature poly-microbienne de l'infection dentaire, l'administration d'un seul antibiotique ne garantit pas une zone exempte de bactéries dans le canal. De plus, l'utilisation d'une antibiothérapie non spécifique permettrait aux microorganismes virulents résiduels de repeupler le canal. Il devient alors nécessaire d'utiliser une combinaison d'antibiotiques afin de contrer le

plus d'agents pathogènes endodontiques possible et de prévenir le développement d'une résistance microbienne ^[108]. C'est la raison pour laquelle l'utilisation des doubles et triples antibiotiques est préconisée en endodontie ^[217].

Le principe d'appliquer des antibiotiques directement au niveau du site infectieux est valide. Il vient avec beaucoup d'avantages dont une désinfection efficace et prévisible, une concentration locale élevée du médicament, une réduction des complications dues aux antibiotiques systémiques. Cependant, l'application locale d'antibiotiques a ses inconvénients: la sélection possible des souches bactériennes résistantes aux antibiotiques, des réactions allergiques, l'inhibition de l'angiogenèse et la décoloration des dents ^[218].

Face aux effets cytotoxiques et aux limitations des agents antimicrobiens en endodontie, les recherches ont été réorientées pour trouver l'agent antimicrobien idéal dans le contexte de l'endodontie. C'est ainsi que les peptides antimicrobiens ont suscité l'intérêt des chercheurs en microbiologie et sont devenus un domaine de recherche prometteur. Les peptides antimicrobiens (PAMs) sont des oligopeptides composés d'acides aminés dont le nombre varie de cinq à plus d'une centaine. Ils peuvent agir sur différents types de microorganismes : bactéries, champignons, virus et parasites ^[9]. Ces peptides sont groupés en deux grandes catégories : les peptides naturels produits par des organismes vivants et les peptides synthétiques ^[222]. Au total, plus de 5 000 PAMs ont été découverts ou synthétisés à ce jour ^[9,138]. En endodontie, les peptides antimicrobiens (PAMs) pourraient remédier aux limitations liées à l'utilisation des antibiotiques. À titre d'exemple, des chercheurs ont démontré qu'un peptide antimicrobien synthétique, le KSL- W, était efficace pour réduire la croissance microbienne ^[195].

Une étude importante en endodontie, destinée à évaluer *in vitro* l'effet des médicaments intra-canalaire couramment utilisés sur la survie des cellules souches humaines de la papille apicale (SCAP), a été réalisée par Ruparel et collègues. Selon cette étude, les triples et doubles (TAP/DAP) antibiotiques locaux possédaient un effet cytotoxique sur les cellules souches pulpaire aux concentrations de 1, 10 et 100 mg/ml. Ces résultats dénotent le problème inhérent à l'utilisation des antibiotiques d'une manière locale et

qui consiste à choisir adéquatement les concentrations de manière à obtenir une bonne efficacité antibactérienne sans toxicité sur les cellules souches pulpaire^[114].

L'effet néfaste des TAP/DAP a été confirmé dans nos recherches où il a été démontré que les antibiotiques locaux utilisés aux doses suivantes : 0,125; 0,25 ; 0,5 1 mg/ml étaient cytotoxiques pour les DPSC.

Il a été démontré que les irrigants habituellement utilisés en endodontie ont un effet profond et durable sur la survie des cellules souches de la papille apicale. Il devient alors nécessaire d'évaluer les effets de chacun de ces irrigants utilisés lors des procédures de régénération impliquant les cellules souches. En effet, il existe encore un manque de connaissances concernant l'impact des agents intracanaux sur les cellules souches. Il est normal de penser que les cellules souches de la papille apicale puissent être affectées d'une manière négative par l'extrusion ou la diffusion des agents antimicrobiens au niveau de la papille apicale. En outre, les médicaments résiduels au niveau du système canalaire pourraient aussi affecter la survie des cellules souches lorsque celles-ci sont introduites à l'intérieur du canal par l'induction mécanique d'un saignement^[114].

Ainsi, en raison des effets cytotoxiques démontrés des antibiotiques locaux sur les cellules souches pulpaire et apicales, les chercheurs ont investigué d'autres agents antimicrobiens tels que le paramonochlorophénol camphré, le phénol camphré et l'hydroxyde de calcium^[219]. Depuis son introduction dans la dentisterie par Hermann en 1920, l'hydroxyde de calcium, a été indiquée dans beaucoup de situations cliniques^[220].

L'hydroxyde de calcium est un agent polyvalent dont l'utilisation est de plus en plus indiquée dans le coiffage de la pulpe, l'apexogénèse, le traitement de la résorption radiculaire, les perforations radiculaires iatrogènes, mais il est surtout utilisé comme un agent antimicrobien intracanalair entre les rendez-vous^[221].

Une étude in vitro a été menée afin d'examiner la cytotoxicité de l'hydroxyde de calcium sur les fibroblastes de la pulpe dentaire. Les fibroblastes ont été isolés à partir de la pulpe dentaire des troisièmes molaires pour ensuite être cultivés jusqu'à atteindre 80 % de confluence. Par la suite, les fibroblastes ont été exposés à plusieurs concentrations

d'hydroxyde de calcium. La viabilité des fibroblastes a été évaluée après 72 heures. Le pourcentage de viabilité cellulaire a été calculé et la cytotoxicité du médicament a été classée comme suit : sévère (30% de viabilité), modérée (30-60%), légère (60-90%) et non toxique (> 90%). Les résultats ont montré que le Ca (OH)₂ à une concentration de 1 mg/ml était sévèrement cytotoxique, comparé au groupe témoin. Le Ca (OH)₂ à une concentration de 10 mg/ml était également très toxique, toujours comparé au groupe témoin. L'étude a conclu à une cytotoxicité sévère de l'hydroxyde de calcium sur les fibroblastes, lorsqu'il est utilisé aux concentrations de 1 et 10 mg/ml. Ainsi, la cytotoxicité de l'hydroxyde de calcium dépend de sa concentration dans le milieu^[118]. La cytotoxicité du Ca (OH)₂ peut être attribuée à son pH élevé. En raison de son pH élevé, le Ca (OH)₂ peut provoquer une nécrose ou une apoptose cellulaire^[115].

Dans une autre étude, les docteurs Park et Rouabhia ont étudié l'effet du peptide antimicrobien synthétique KSL-W, à des concentrations de 50 et 100 µg/ml, sur la croissance des fibroblastes gingivaux humains, leur migration, la contraction du gel de collagène et l'expression des protéines d'actine au niveau des muscles lisses. Les résultats ont montré que le peptide KSL-W favorisait l'attachement primaire des fibroblastes gingivaux humains, l'expression des filaments d'actine et la croissance cellulaire. De plus, le peptide KSL-W a augmenté la sécrétion des métalloprotéinases MMP-1, MMP-2, TIMP-1 et TIMP-2 par les fibroblastes gingivaux humains. Le peptide a également favorisé la migration cellulaire et la guérison des blessures et a favorisé la contraction du gel de collagène. Ainsi, les chercheurs ont démontré que le peptide KSL-W améliore la croissance, la migration et la sécrétion des métalloprotéinases des fibroblastes gingivaux et l'expression de l'actine des muscles lisses, favorisant ainsi la guérison des blessures^[10].

Parmi les peptides antimicrobiens étudiés, le peptide KSL-W a démontré une stabilité adéquate dans des conditions orales simulées, tout en ayant une activité antimicrobienne à large spectre. De plus, le peptide KSL-W s'est révélé très efficace pour réduire la croissance des bactéries impliquées dans l'infection endodontique^[195]. En plus de leur capacité à éliminer les bactéries, certains peptides antimicrobiens peuvent promouvoir la guérison tissulaire. Dans l'étude des docteurs Park et Rouabhia,

l'effet du peptide antimicrobien KSL-W sur la croissance des fibroblastes semble avoir lieu au niveau des phases S et G2/M du cycle cellulaire. où un plus grand nombre de cellules traitées avec le KSL-W a été observé. L'adhérence et la prolifération des fibroblastes traitées avec le KSL-W pourraient indiquer une augmentation de leur activité physiologique en stimulant la sécrétion des inhibiteurs des MMPs (TIMPs) ^[10].

Une énorme progression a été réalisée dans le domaine endodontique. Cette évolution concerne toutes les sphères de l'endodontie incluant l'instrumentation et la désinfection canalaire. Ainsi, le taux de succès des traitements endodontiques s'est grandement amélioré. Cependant, il reste des cas d'échec en raison des limitations des techniques d'instrumentation et de désinfection canalaire, et un progrès au niveau de la conception d'une solution de désinfection canalaire idéale s'avère nécessaire ^[82].

Dans la littérature, beaucoup de peptides antimicrobiens présentant une excellente activité antimicrobienne contre le microbiote endodontique à une faible concentration inhibitrice ont été rapportés, notamment le cas du *P28*, *Human neutrophil defensin 1* et le *Mellitin*. Ces derniers peuvent moduler une réponse immunitaire exacerbée. En outre, certains PAMs comme le *Human beta-defensin (HBD) 3* et le *LL-37* sont biocompatibles et peuvent promouvoir la régénération tissulaire et même avoir un rôle au niveau de la suppression de l'ostéoclastogénèse. Ainsi, ces biomolécules peuvent permettre l'élimination des microorganismes tout en modulant le système immunitaire ^[9,201]. Cependant, il manque des études sur l'implication des peptides antimicrobiens d'une manière directe dans le domaine de l'endodontie ^[201].

C'est dans cette optique que nous avons évalué l'effet du KSL-W sur les cellules pulpaire. Nos travaux ont montré que ce peptide n'a pas d'effet toxique sur les cellules testées. Nos travaux semblent indiquer que le KSL-W pourrait être utilisé pour le contrôle des infections endodontiques, sans avoir des effets négatifs sur les cellules de l'hôte.

Tout ceci nous indique que le traitement en endodontie avec les peptides antimicrobiens est une approche prometteuse. Cependant, il faut reconnaître que les recherches portant sur l'activité des PAMs et leur rôle antimicrobien et antiviral sont

majoritairement in vitro. Ainsi, les mécanismes d'action exacts de ces biomolécules dans des conditions physiologiques reflétant la réalité doivent être étudiés. Il est donc nécessaire de mener de nouvelles études in vivo pour évaluer l'efficacité de l'utilisation de ces biomolécules dans la thérapie endodontique. Il est également nécessaire de s'assurer d'avoir les moyens de produire ces PAMs en grande échelle et à faible coût ^[136].

Étant donné que la désinfection canalaire est une étape cruciale dans le succès du traitement endodontique, il est primordial d'évaluer la possibilité d'utiliser les PAMs dont le KSL- W comme agent d'irrigation canalaire. L'élimination de l'infection du système canalaire et aussi la modulation de la réponse immunitaire au niveau de la région périapicale par des peptides antimicrobiens pourraient permettre de contrer l'effet néfaste de l'ostéoclastogénèse et l'apposition osseuse. La conséquence en serait l'obtention de niveaux de réussite plus élevés dans les thérapies endodontiques. Les PAMs pourraient avoir un impact positif en conduisant à une survie plus longue des dents en bouche.

Conclusion

L'utilisation des agents antimicrobiens est toujours indispensable en endodontie. Parmi ces agents; les pâtes des double et triple antibiotiques et l'hydroxyde de calcium sont les plus utilisés. Il est clair que ces derniers possèdent des limitations, soit d'un point de vue pharmacologique ou esthétique. De plus, la cytotoxicité des antibiotiques locaux et de l'hydroxyde de calcium sur les cellules pulpaires est bien documentée. Ceci a une grande implication au niveau de l'endodontie dégénérative en raison du rôle primordial des cellules souches de la pulpe dentaire. Ainsi, l'agent antimicrobien idéal en endodontie n'existe toujours pas; d'où la nécessité de continuer les recherches scientifiques pour trouver l'agent endodontique antimicrobien idéal et qui est sans toxicité sur les cellules pulpaires.

Notre équipe, sous la supervision du Dr Rouabhia, a déjà démontré que le peptide antimicrobien KSL-W favorise l'adhésion, la prolifération et la migration des fibroblastes gingivaux. Ainsi, nos recherches ont été orientées sur l'analyse et l'étude de l'effet du peptide antimicrobien KSL-W sur les cellules souches pulpaires.

Nos résultats démontrent clairement que le KSL-W n'a pas affecté négativement l'adhésion ou la viabilité des DPSC, comparativement aux antibiotiques. En plus, il est intéressant de noter que le peptide antimicrobien KSL-W a favorisé la migration des cellules souches de la pulpe dentaire.

Un traitement antimicrobien à base de KSL-W pourrait être conçu et utilisé dans le domaine de l'endodontie régénératrice. Il serait aussi possible de combiner le peptide KSL-W à d'autres agents antimicrobiens utilisés en endodontie pour y inclure des propriétés antimicrobiennes dans les différents produits d'irrigation.

Bibliographie/médiagraphie

1. DEMARCO F. F., CONDE M. C. M., CAVALCANTI B. N., CASAGRANDE L., SAKAI V. T. & NÖR J. E. « Dental pulp tissue engineering ». *Brazilian dental journal* (2011). Vol. 22, n°1, p. 3-13.
2. CAUFIELD P., SCHÖN C., SARAITHONG P., LI Y. & ARGIMÓN S. « Oral lactobacilli and dental caries: a model for niche adaptation in humans ». *Journal of dental research* (2015). Vol. 94, n°9_suppl, p. 110S-118S.
3. HAHN C.-L. & LIEWEHR F. R. « Relationships between caries bacteria, host responses, and clinical signs and symptoms of pulpitis ». *Journal of endodontics* (2007). Vol. 33, n°3, p. 213-219.
4. GROSSMAN L. I. « Origin of microorganisms in traumatized, pulpless, sound teeth ». *Journal of Endodontics* (1982). Vol. 8, p. S16-S17.
5. FONTANA M. & GONZÁLEZ-CABEZAS C. « Secondary caries and restoration replacement: An unresolved problem. ». *Compendium of continuing education in dentistry (Jamesburg, NJ: 1995)* (2000). Vol. 21, n°1, p. 15-8.
6. NAIR P. R., PAJAROLA G. & SCHROEDER H. E. « Types and incidence of human periapical lesions obtained with extracted teeth ». *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology* (1996). Vol. 81, n°1, p. 93-102.
7. CHEN Y., JOVANI-SANCHO M. DEL M. & SHETH C. C. « Is revascularization of immature permanent teeth an effective and reproducible technique? ». *Dental Traumatology* (2015). Vol. 31, n°6, p. 429-436.
8. AL-GHAMDI N. S. & AL-NAZHAN S. « Pulp revascularization of immature maxillary first premolar ». *Journal of conservative dentistry: JCD* (2015). Vol. 18, n°6, p. 496.
9. BAHAR A. & REN D. « Antimicrobial peptides ». *Pharmaceuticals* (2013). Vol. 6, n°12, p. 1543-1575.
10. PARK H.-J., SALEM M., SEMLALI A., LEUNG K. P. & ROUABHIA M. « Antimicrobial peptide KSL-W promotes gingival fibroblast healing properties in vitro ». *Peptides* (2017). Vol. 93, p. 33-43.
11. SMARTT JR J. M., LOW D. W. & BARTLETT S. P. « The pediatric mandible: I. A primer on growth and development ». *Plastic and Reconstructive Surgery* (2005). Vol. 116, n°1, p. 14e-23e.
12. CHUN K. J., CHOI H. & LEE J. « Comparison of mechanical property and role between enamel and dentin in the human teeth ». *Journal of dental biomechanics* (2014). Vol. 5,.
13. COLSTON B. W., EVERETT M. J., DA SILVA L. B., OTIS L. L., STROEVE P. & NATHIEL H. « Imaging of hard- and soft-tissue structure in the oral cavity by optical coherence tomography ». *Applied Optics* (1998). Vol. 37, n°16, p. 3582-3585.
14. TEN CATE A. & NANJI A. *Ten Cate's oral histology: development, structure, and function*. Elsevier, 2013. ISBN : 0-323-07846-X.
15. WANG X., XIA C., ZHANG Z., DENG X., WEI S., ZHENG G. & CHEN H. « Direct growth of human enamel-like calcium phosphate microstructures on human tooth ». *Journal of nanoscience and nanotechnology* (2009). Vol. 9, n°2, p. 1361-1364.
16. KUNIN A. A., EVDOKIMOVA A. Y. & MOISEEVA N. S. « Age-related differences of tooth enamel morphochemistry in health and dental caries ». *EPMA Journal* (2015). Vol. 6, n°1, p. 3.

17. OTAWA-KAMOGASHIRA N., MATSUDA Y., TAKEZAKI M., HATAKEYAMA Y., TAMAOKI S. & ISHIKAWA H. « Immunohistochemical Study of Amelogenin Binding Proteins in an Amelogenin Point Mutation Mouse. ». *International Journal of Morphology* (2019). Vol. 37, n°2,.
18. BOYDE A. « The development of enamel structure ». (1967).
19. SIMMER J. P. & HU J. « Dental enamel formation and its impact on clinical dentistry ». *Journal of dental education* (2001). Vol. 65, n°9, p. 896-905.
20. MORADIAN-OLDAK J. « The regeneration of tooth enamel ». *Dimensions of dental hygiene* (2009). Vol. 7, n°8, p. 12.
21. LACRUZ R. S., HABELITZ S., WRIGHT J. T. & PAINE M. L. « Dental enamel formation and implications for oral health and disease ». *Physiological reviews* (2017). Vol. 97, n°3, p. 939-993.
22. CHERSONI S., BERTACCI A., PASHLEY D. H., TAY F. R., MONTEBUGNOLI L. & PRATI C. « In vivo effects of fluoride on enamel permeability ». *Clinical oral investigations* (2011). Vol. 15, n°4, p. 443-449.
23. GOLDBERG M., KULKARNI A. B., YOUNG M. & BOSKEY A. « Dentin: Structure, Composition and Mineralization: The role of dentin ECM in dentin formation and mineralization ». *Frontiers in bioscience (Elite edition)* (2011). Vol. 3, p. 711.
24. COUBLE M.-L., FARGES J.-C., BLEICHER F., PERRAT-MABILLON B., BOUDEULLE M. & MAGLOIRE H. « Odontoblast differentiation of human dental pulp cells in explant cultures ». *Calcified Tissue International* (2000). Vol. 66, n°2, p. 129-138.
25. HARGREAVES K. M., GOODIS H. E. & TAY F. R. *Seltzer and Bender's dental pulp*. Quintessence Chicago, 2012. ISBN : 0-86715-480-2.
26. KAGAYAMA M., SASANO Y., SATO H., KAMAKURA S., MOTEGI K. & MIZOGUCHI I. « Confocal microscopy of dentinal tubules in human tooth stained with alizarin red ». *Anatomy and embryology* (1999). Vol. 199, n°3, p. 233-238.
27. JOHNSON G. & BRÄNNSTRÖM M. « The sensitivity of dentin changes in relation to conditions at exposed tubule apertures ». *Acta Odontologica Scandinavica* (1974). Vol. 32, n°1, p. 29-38.
28. KUTTNER Y. « Classification of dentine into primary, secondary, and tertiary ». *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology* (1959). Vol. 12, n°8, p. 996-1001.
29. PAEWINSKY E., PFEIFFER H. & BRINKMANN B. « Quantification of secondary dentine formation from orthopantomograms—a contribution to forensic age estimation methods in adults ». *International journal of legal medicine* (2005). Vol. 119, n°1, p. 27-30.
30. D'SOUZA R., BACHMAN T., BAUMGARDNER K., BUTLER W. & LITZ M. « Characterization of cellular responses involved in reparative dentinogenesis in rat molars ». *Journal of dental research* (1995). Vol. 74, n°2, p. 702-709.
31. BJØRNDAL L. « Presence or absence of tertiary dentinogenesis in relation to caries progression ». *Advances in dental research* (2001). Vol. 15, n°1, p. 80-83.
32. GHAVAMNASIRI M., MOUSAVINASAB M. & MOHTASHAM N. « A histopathologic study on pulp response to glass ionomer cements in human teeth ». *Journal of Dentistry of Tehran University of Medical Sciences* (2005). p. 135-141.
33. SMITH A. J., CASSIDY N., PERRY H., BEGUE-KIRN C., RUCH J.-V. & LESOT H. « Reactionary dentinogenesis. ». *International Journal of Developmental Biology* (2003). Vol. 39, n°1, p. 273-280.

34. YAMAMOTO T., HASEGAWA T., YAMAMOTO T., HONGO H. & AMIZUKA N. « Histology of human cementum: Its structure, function, and development ». *Japanese Dental Science Review* (2016). Vol. 52, n°3, p. 63-74.
35. TZIAFAS D. « Composition and structure of cementum: Strategies for bonding ». In : *Dental Hard Tissues and Bonding* Springer, 2005. p. 177-193.
36. STEINFORT J., DEBLAUWE B. & BEERTSEN W. « The inorganic components of cementum-and enamel-related dentin in the rat incisor ». *Journal of dental research* (1990). Vol. 69, n°6, p. 1287-1292.
37. HANDA K., SAITO M., TSUNODA A., YAMAUCHI M., HATTORI S., SATO S., TOYODA M., TERANAKA T. & NARAYANAN A. S. « Progenitor cells from dental follicle are able to form cementum matrix in vivo ». *Connective tissue research* (2002). Vol. 43, n°2-3, p. 406-408.
38. TENORIO D., CRUCHLEY A. & HUGHES F. « Immunocytochemical investigation of the rat cementoblast phenotype ». *Journal of periodontal research* (1993). Vol. 28, n°6, p. 411-419.
39. FURSETH R. « The fine structure of acellular cementum in young human premolars ». *European Journal of Oral Sciences* (1974). Vol. 82, n°6, p. 437-441.
40. HARRY M. & SIMS M. « Root resorption in bicuspid intrusion: a scanning electron microscope study ». *The Angle Orthodontist* (1982). Vol. 52, n°3, p. 235-258.
41. KRASNER P. & RANKOW H. J. « Anatomy of the pulp-chamber floor ». *Journal of endodontics* (2004). Vol. 30, n°1, p. 5-16.
42. VERTUCCI F. J. « Root canal anatomy of the human permanent teeth ». *Oral surgery, oral medicine, oral pathology* (1984). Vol. 58, n°5, p. 589-599.
43. HOLLAND G. & ROBINSON P. « The number and size of axons at the apex of the cat's canine tooth ». *The Anatomical Record* (1983). Vol. 205, n°2, p. 215-222.
44. KRAMER I. R. « The vascular architecture of the human dental pulp ». *Archives of oral biology* (1960). Vol. 2, n°3, p. 177-189.
45. FRANÇA C. M., THRIVIKRAMAN G., ATHIRASALA A., TAHAYERI A., GOWER L. B. & BERTASSONI L. E. « The influence of osteopontin-guided collagen intrafibrillar mineralization on pericyte differentiation and vascularization of engineered bone scaffolds ». *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials* (2019). Vol. 107, n°5, p. 1522-1532.
46. LOPEZ-MARCOS J. « Aetiology, classification and pathogenesis of pulp and periapical disease. ». *Medicina Oral, Patología Oral y Cirugía Bucal* (2004). Vol. 9, p. 58-62.
47. GRONTHOS S., MANKANI M., BRAHIM J., ROBESY P. G. & SHI S. « Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* (2000). Vol. 97, n°25, p. 13625-13630.
48. GOLDBERG M. & LASFARGUES J.-J. « Pulpo-dentinal complex revisited ». *Journal of dentistry* (1995). Vol. 23, n°1, p. 15-20.
49. PASHLEY D. H. « Dynamics of the pulpo-dentin complex ». *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine* (1996). Vol. 7, n°2, p. 104-133.
50. TSUKADA K. « Ultrastructure of the relationship between odontoblast processes and nerve fibres in dentinal tubules of rat molar teeth ». *Archives of oral biology* (1987). Vol. 32, n°2, p. 87-92.
51. VONGSAVAN N. & MATTHEWS B. « Fluid flow through cat dentine in vivo ». *Archives of Oral Biology* (1992). Vol. 37, n°3, p. 175-185.
52. SCHEID R. C. & WEISS G. « Woeffel'S Dental Anatomy Edition Eight ».

53. OCHSENBEIN C. & ROSS S. « A reevaluation of osseous surgery. ». *Dental Clinics of North America* (1969). Vol. 13, n°1, p. 87.
54. BEERTSEN W., McCULLOCH C. A. & SODEK J. « The periodontal ligament: a unique, multifunctional connective tissue ». *Periodontology 2000* (1997). Vol. 13, n°1, p. 20-40.
55. KANZAKI H., CHIBA M., SHIMIZU Y. & MITANI H. « Periodontal ligament cells under mechanical stress induce osteoclastogenesis by receptor activator of nuclear factor κ B ligand up-regulation via prostaglandin E2 synthesis ». *Journal of Bone and Mineral Research* (2002). Vol. 17, n°2, p. 210-220.
56. GAY I. C., CHEN S. & MACDOUGALL M. « Isolation and characterization of multipotent human periodontal ligament stem cells ». *Orthodontics & craniofacial research* (2007). Vol. 10, n°3, p. 149-160.
57. ANDERSON K. V. & MAHAN P. E. « Interaction of tooth pulp and periodontal ligament receptors in a jaw-depression reflex ». *Experimental neurology* (1971). Vol. 32, n°2, p. 295-302.
58. NANJI A. & BOSSHARDT D. D. « Structure of periodontal tissues in health and disease ». *Periodontology 2000* (2006). Vol. 40, n°1, p. 11-28.
59. SAFFAR J., LASFARGUES J. & CHERRUAU M. « Alveolar bone and the alveolar process: the socket that is never stable ». *Periodontology 2000* (1997). Vol. 13, n°1, p. 76-90.
60. SEBAOUN J., KANTARCI A., TURNER J. W., CARVALHO R. S., VAN DYKE T. E. & FERGUSON D. J. « Modeling of trabecular bone and lamina dura following selective alveolar decortication in rats ». *Journal of periodontology* (2008). Vol. 79, n°9, p. 1679-1688.
61. RAFINI F., PRIAMINIARTI M., SUKARDI I. & LESSANG R. « Digital radiographic evaluation of alveolar bone loss, density and lamina dura integrity on post splinting mandibular anterior with chronic periodontitis ». In : *Journal of Physics: Conference Series*. IOP Publishing, 2017. p. 012053. ISBN : 1742-6596.
62. ARAÚJO M. G. & LINDHE J. « Dimensional ridge alterations following tooth extraction. An experimental study in the dog ». *Journal of clinical periodontology* (2005). Vol. 32, n°2, p. 212-218.
63. MELSEN B. « Biological reaction of alveolar bone to orthodontic tooth movement ». *The Angle Orthodontist* (1999). Vol. 69, n°2, p. 151-158.
64. SQUIER C. A. & KREMER M. J. « Biology of oral mucosa and esophagus ». *JNCI Monographs* (2001). Vol. 2001, n°29, p. 7-15.
65. SCHROEDER H. E. & LISTGARTEN M. A. « The gingival tissues: the architecture of periodontal protection ». *Periodontology 2000* (1997). Vol. 13, n°1, p. 91-120.
66. LOZDAN J. & SQUIER C. « The histology of the muco-gingival junction ». *Journal of periodontal research* (1969). Vol. 4, n°2, p. 83-93.
67. HO D. K., GHINEA R., HERRERA L. J., ANGELOV N. & PARAVINA R. D. « Color range and color distribution of healthy human gingiva: A prospective clinical study ». *Scientific reports* (2015). Vol. 5, p. 18498.
68. ROSS M. & PAWLINA W. *Histology, A text and atlas, with correlated cell and molecular biology*. Lippincott Williams & Wilkins, 2017.
69. BADET C. & RICHARD B. « Étude clinique de la carie ». *EMC-Dentisterie* (2004). Vol. 1, n°1, p. 40-48.
70. LAVIGNE G., WODA A., TRUELOVE E., SHIP J. A., DAO T. & GOULET J.-P. « Mechanisms associated with unusual orofacial pain ». *Journal of Orofacial Pain* (2005). Vol. 19, n°1, p. 9-21.

71. FEATHERSTONE J. D. « Dental caries: a dynamic disease process ». *Australian dental journal* (2008). Vol. 53, n°3, p. 286-291.
72. HAHN C.-L. & LIEWEHR F. R. « Innate immune responses of the dental pulp to caries ». *Journal of endodontics* (2007). Vol. 33, n°6, p. 643-651.
73. FARGES J.-C., CARROUEL F., KELLER J.-F., BAUDOIN C., MSIKA P., BLEICHER F. & STAQUET M.-J. « Cytokine production by human odontoblast-like cells upon Toll-like receptor-2 engagement ». *Immunobiology* (2011). Vol. 216, n°4, p. 513-517.
74. NIE X., TIAN W., ZHANG Y., CHEN X., DONG R., JIANG M., CHEN F. & JIN Y. « Induction of transforming growth factor-beta 1 on dentine pulp cells in different culture patterns ». *Cell biology international* (2006). Vol. 30, n°4, p. 295-300.
75. MAGLOIRE H., BOUVIER M. & JOFFRE A. « Odontoblast response under carious lesions. ». *Proceedings of the Finnish Dental Society. Suomen Hammaslaakariseuran toimituksia* (1992). Vol. 88, p. 257-274.
76. JAIN N. & GUPTA A. « An insight into neurophysiology of pulpal pain: facts and hypotheses ». *The Korean journal of pain* (2013). Vol. 26, n°4, p. 347.
77. TURNER M. D., NEDJAI B., HURST T. & PENNINGTON D. J. « Cytokines and chemokines: at the crossroads of cell signalling and inflammatory disease ». *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research* (2014). Vol. 1843, n°11, p. 2563-2582.
78. RODD H. D. & BOISSONADE F. M. « Substance P expression in human tooth pulp in relation to caries and pain experience ». *European Journal of Oral Sciences* (2000). Vol. 108, n°6, p. 467-474.
79. MUDIE A. S. & HOLLAND G. R. « Local opioids in the inflamed dental pulp ». *Journal of endodontics* (2006). Vol. 32, n°4, p. 319-323.
80. LEVIN L. G., LAW A. S., HOLLAND G., ABBOTT P. V. & RODA R. S. « Identify and define all diagnostic terms for pulpal health and disease states ». *Journal of Endodontics* (2009). Vol. 35, n°12, p. 1645-1657.
81. GUTMANN J. L., BAUMGARTNER J. C., GLUSKIN A. H., HARTWELL G. R. & WALTON R. E. « Identify and define all diagnostic terms for periapical/periradicular health and disease states ». *Journal of endodontics* (2009). Vol. 35, n°12, p. 1658-1674.
82. HARGREAVES K. M. & BERMAN L. H. *Cohen's pathways of the pulp expert consult*. Elsevier Health Sciences, 2015. ISBN : 0-323-09635-2.
83. FORMAN H. J. & TORRES M. « Signaling by the respiratory burst in macrophages ». *IUBMB life* (2001). Vol. 51, n°6, p. 365-371.
84. DAHLGREN C. & KARLSSON A. « Respiratory burst in human neutrophils ». *Journal of immunological methods* (1999). Vol. 232, n°1-2, p. 3-14.
85. NARAYANAN L. L. & VAISHNAVI C. « Endodontic microbiology ». *Journal of conservative dentistry: JCD* (2010). Vol. 13, n°4, p. 233.
86. ROLAND B. « Les cellules souches ». *Actualités Odonto-Stomatologiques* (2014). n°268,.
87. PIERDOMENICO L., BONSI L., CALVITTI M., RONDELLI D., ARPINATI M., CHIRUMBOLO G., BECCHETTI E., MARCHIONNI C., ALVIANO F. & FOSSATI V. « Multipotent mesenchymal stem cells with immunosuppressive activity can be easily isolated from dental pulp ». *Transplantation* (2005). Vol. 80, n°6, p. 836-842.

88. HUANG G. T.-J. « A paradigm shift in endodontic management of immature teeth: conservation of stem cells for regeneration ». *Journal of dentistry* (2008). Vol. 36, n°6, p. 379-386.
89. HUANG G.-J., GRONTHOS S. & SHI S. « Mesenchymal stem cells derived from dental tissues vs. those from other sources: their biology and role in regenerative medicine ». *Journal of dental research* (2009). Vol. 88, n°9, p. 792-806.
90. POTDAR P. D. « Human dental pulp stem cells: Applications in future regenerative medicine ». *World Journal of Stem Cells* (2015). Vol. 7, n°5, p. 839. Identifiant DOI[®] 10.4252/wjsc.v7.i5.839.
91. SONOYAMA W., LIU Y., FANG D., YAMAZA T., SEO B.-M., ZHANG C., LIU H., GRONTHOS S., WANG C.-Y. & SHI S. « Mesenchymal stem cell-mediated functional tooth regeneration in swine ». *PloS one* (2006). Vol. 1, n°1, p. e79.
92. ZEICHNER-DAVID M., OISHI K., SU Z., ZAKARTCHENKO V., CHEN L., ARZATE H. & BRINGAS JR P. « Role of Hertwig's epithelial root sheath cells in tooth root development ». *Developmental dynamics: an official publication of the American Association of Anatomists* (2003). Vol. 228, n°4, p. 651-663.
93. SELVIG K. A. « Electron microscopy of Hertwig's epithelial sheath and of early dentin and cementum formation in the mouse incisor ». *Acta Odontologica Scandinavica* (1963). Vol. 21, n°2, p. 175-186.
94. BAKOPOULOU A., LEYHAUSEN G., VOLK J., TSIFTSOGLOU A., GAREFIS P., KOIDIS P. & GEURTSSEN W. « Comparative analysis of in vitro osteo/odontogenic differentiation potential of human dental pulp stem cells (DPSCs) and stem cells from the apical papilla (SCAP) ». *Archives of oral biology* (2011). Vol. 56, n°7, p. 709-721.
95. FITZGERALD M., CHIEGO JR D. & HEYS D. « Autoradiographic analysis of odontoblast replacement following pulp exposure in primate teeth ». *Archives of oral biology* (1990). Vol. 35, n°9, p. 707-715.
96. SONOYAMA W., LIU Y., YAMAZA T., TUAN R. S., WANG S., SHI S. & HUANG G. T.-J. « Characterization of the apical papilla and its residing stem cells from human immature permanent teeth: a pilot study ». *Journal of endodontics* (2008). Vol. 34, n°2, p. 166-171.
97. POTDAR P. D. & JETHMALANI Y. D. « Human dental pulp stem cells: Applications in future regenerative medicine ». *World journal of stem cells* (2015). Vol. 7, n°5, p. 839.
98. DATTA I., BHADRI N., SHAHANI P., MAJUMDAR D., SOWMITHRA S., RAZDAN R. & BHONDE R. « Functional recovery upon human dental pulp stem cell transplantation in a diabetic neuropathy rat model ». *Cytotherapy* (2017). Vol. 19, n°10, p. 1208-1224. Identifiant DOI[®] 10.1016/j.jcyt.2017.07.009.
99. GRONTHOS S., BRAHIM J., LI W., FISHER L., CHERMAN N., BOYDE A., DENBESTEN P., ROBESY P. G. & SHI S. « Stem cell properties of human dental pulp stem cells ». *Journal of dental research* (2002). Vol. 81, n°8, p. 531-535.
100. LOVELACE T. W., HENRY M. A., HARGREAVES K. M. & DIOGENES A. « Evaluation of the delivery of mesenchymal stem cells into the root canal space of necrotic immature teeth after clinical regenerative endodontic procedure ». *Journal of endodontics* (2011). Vol. 37, n°2, p. 133-138.

101. CEHRELI Z. C., ISBITIREN B., SARA S. & ERBAS G. « Regenerative endodontic treatment (revascularization) of immature necrotic molars medicated with calcium hydroxide: a case series ». *Journal of endodontics* (2011). Vol. 37, n°9, p. 1327-1330.
102. MAO J. J., KIM S. G., ZHOU J., YE L., CHO S., SUZUKI T., FU S. Y., YANG R. & ZHOU X. « Regenerative endodontics: barriers and strategies for clinical translation ». *Dental Clinics* (2012). Vol. 56, n°3, p. 639-649.
103. PENG W., LIU W., ZHAI W., JIANG L., LI L., CHANG J. & ZHU Y. « Effect of tricalcium silicate on the proliferation and odontogenic differentiation of human dental pulp cells ». *Journal of endodontics* (2011). Vol. 37, n°9, p. 1240-1246.
104. GRAHAM L., COOPER P. R., CASSIDY N., NOR J. E., SLOAN A. J. & SMITH A. J. « The effect of calcium hydroxide on solubilisation of bio-active dentine matrix components ». *Biomaterials* (2006). Vol. 27, n°14, p. 2865-2873.
105. BANSAL R. & JAIN A. « Overview on the current antibiotic containing agents used in endodontics ». *North American journal of medical sciences* (2014). Vol. 6, n°8, p. 351.
106. VIJAYARAGHAVAN R., MATHIAN V. M., SUNDARAM A. M., KARUNAKARAN R. & VINODH S. « Triple antibiotic paste in root canal therapy ». *Journal of pharmacy & bioallied sciences* (2012). Vol. 4, n°Suppl 2, p. S230.
107. BEZGIN T. & SÖNMEZ H. « Review of current concepts of revascularization/revitalization ». *Dental Traumatology* (2015). Vol. 31, n°4, p. 267-273.
108. MOHAMMADI Z., JAFARZADEH H., SHALAVI S., YARIPOUR S., SHARIFI F. & KINOSHITA J.-I. « A review on triple antibiotic paste as a suitable material used in regenerative endodontics ». *Iranian endodontic journal* (2018). Vol. 13, n°1, p. 1.
109. JESKE A. H. *Mosby's Dental Drug Reference-E-Book*. Elsevier Health Sciences, 2011. ISBN : 0-323-08623-3.
110. HOSHINO E., KURIHARA-ANDO N., SATO I., UEMATSU H., SATO M., KOTA K. & IWAKU M. « In-vitro antibacterial susceptibility of bacteria taken from infected root dentine to a mixture of ciprofloxacin, metronidazole and minocycline ». *International endodontic journal* (1996). Vol. 29, n°2, p. 125-130.
111. AKGUN O. M., ALTUN C. & GUVEN G. « Use of triple antibiotic paste as a disinfectant for a traumatized immature tooth with a periapical lesion: a case report ». *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology* (2009). Vol. 108, n°2, p. e62-e65.
112. KAHLER B. & ROSSI-FEDELE G. « A review of tooth discoloration after regenerative endodontic therapy ». *Journal of endodontics* (2016). Vol. 42, n°4, p. 563-569.
113. KIM J.-H., KIM Y., SHIN S.-J., PARK J.-W. & JUNG I.-Y. « Tooth discoloration of immature permanent incisor associated with triple antibiotic therapy: a case report ». *Journal of endodontics* (2010). Vol. 36, n°6, p. 1086-1091.
114. RUPAREL N. B., TEIXEIRA F. B., FERRAZ C. C. & DIOGENES A. « Direct effect of intracanal medicaments on survival of stem cells of the apical papilla ». *Journal of endodontics* (2012). Vol. 38, n°10, p. 1372-1375.
115. MOHAMMADI Z., SHALAVI S. & YAZDIZADEH M. « Antimicrobial activity of calcium hydroxide in endodontics: a review ». *Chonnam medical journal* (2012). Vol. 48, n°3, p. 133-140.
116. SIQUEIRA JR J. & LOPES H. « Mechanisms of antimicrobial activity of calcium hydroxide: a critical review ». *International endodontic journal* (1999). Vol. 32, n°5, p. 361-369.

117. SCHRÖDER U. « Effects of calcium hydroxide-containing pulp-capping agents on pulp cell migration, proliferation, and differentiation ». *Journal of dental research* (1985). Vol. 64, n°4, p. 541-548.
118. HOSSEINI M. M., ZARE J. M., FESHARAKI M. & OSTAD S. M. « Cytotoxicity of triple antibiotic paste and calcium hydroxide against cultured human dental pulp fibroblasts ». (2015).
119. BHUYAN A., SEAL M. & PENDHARKAR K. « Effectiveness of four different techniques in removing intracanal medicament from the root canals: An in vitro study ». *Contemporary clinical dentistry* (2015). Vol. 6, n°3, p. 309.
120. MARGELOS J., ELIADES G., VERDELIS C. & PALAGHIAS G. « Interaction of calcium hydroxide with zinc oxide-eugenol type sealers: a potential clinical problem ». *Journal of Endodontics* (1997). Vol. 23, n°1, p. 43-48.
121. LEE Y. « Effect of calcium hydroxide application time on dentin ». *Restorative dentistry & endodontics* (2013). Vol. 38, n°3, p. 186.
122. KISHEN A. « Mechanisms and risk factors for fracture predilection in endodontically treated teeth ». *Endodontic topics* (2006). Vol. 13, n°1, p. 57-83.
123. NAKASHIMA M. & IOHARA K. « Regeneration of dental pulp by stem cells ». *Advances in Dental Research* (2011). Vol. 23, n°3, p. 313-319.
124. ALBUQUERQUE M., VALERA M., NAKASHIMA M., NÖR J. & BOTTINO M. « Tissue-engineering-based strategies for regenerative endodontics ». *Journal of dental research* (2014). Vol. 93, n°12, p. 1222-1231.
125. RODRÍGUEZ-LOZANO F. J., BUENO C., INSAUSTI C. L., MESEGUER L., RAMIREZ M., BLANQUER M., MARIN N., MARTÍNEZ S. & MORALEDA J. M. « Mesenchymal stem cells derived from dental tissues ». *International endodontic journal* (2011). Vol. 44, n°9, p. 800-806.
126. IOHARA K., IMABAYASHI K., ISHIZAKA R., WATANABE A., NABEKURA J., ITO M., MATSUSHITA K., NAKAMURA H. & NAKASHIMA M. « Complete pulp regeneration after pulpectomy by transplantation of CD105+ stem cells with stromal cell-derived factor-1 ». *Tissue Engineering Part A* (2011). Vol. 17, n°15-16, p. 1911-1920.
127. NOSRAT A., SEIFI A. & ASGARY S. « Regenerative endodontic treatment (revascularization) for necrotic immature permanent molars: a review and report of two cases with a new biomaterial ». *Journal of endodontics* (2011). Vol. 37, n°4, p. 562-567.
128. JEERUPHAN T., JANTARAT J., YANPISET K., SUWANNAPAN L., KHEWSAWAI P. & HARGREAVES K. M. « Mahidol study 1: comparison of radiographic and survival outcomes of immature teeth treated with either regenerative endodontic or apexification methods: a retrospective study ». *Journal of endodontics* (2012). Vol. 38, n°10, p. 1330-1336.
129. ALOBAID A. S., CORTES L. M., LO J., NGUYEN T. T., ALBERT J., ABU-MELHA A. S., LIN L. M. & GIBBS J. L. « Radiographic and clinical outcomes of the treatment of immature permanent teeth by revascularization or apexification: a pilot retrospective cohort study ». *Journal of endodontics* (2014). Vol. 40, n°8, p. 1063-1070.
130. YAMAUCHI N., NAGAOKA H., YAMAUCHI S., TEIXEIRA F. B., MIGUEZ P. & YAMAUCHI M. « Immunohistological characterization of newly formed tissues after regenerative procedure in immature dog teeth ». *Journal of endodontics* (2011). Vol. 37, n°12, p. 1636-1641.
131. ERAMO S., NATALI A., PINNA R. & MILIA E. « Dental pulp regeneration via cell homing ». *International endodontic journal* (2018). Vol. 51, n°4, p. 405-419.

132. HUANG G. T.-J. « Dental pulp and dentin tissue engineering and regeneration—advancement and challenge ». *Frontiers in bioscience (Elite edition)* (2011). Vol. 3, p. 788.
133. KIM J. Y., XIN X., MOIOLI E. K., CHUNG J., LEE C. H., CHEN M., FU S. Y., KOCH P. D. & MAO J. J. « Regeneration of dental-pulp-like tissue by chemotaxis-induced cell homing ». *Tissue Engineering Part A* (2010). Vol. 16, n°10, p. 3023-3031.
134. WORLD HEALTH ORGANIZATION. « <<http://www.who.int/en/news-room/factsheets/detail/antibiotic-resistance>> (Accessed 09 July 2018). ».
135. CIUMAC D., GONG H., HU X. & LU J. R. « Membrane targeting cationic antimicrobial peptides ». *Journal of colloid and interface science* (2019). Vol. 537, p. 163-185.
136. KANG H.-K., KIM C., SEO C. H. & PARK Y. « The therapeutic applications of antimicrobial peptides (AMPs): a patent review ». *Journal of microbiology* (2017). Vol. 55, n°1, p. 1-12.
137. THE ANTIMICROBIAL PEPTIDE DATABASE. « <http://aps.unmc.edu/AP/main.php> (Accessed 2018 May 30). ».
138. ZHAO X., WU H., LU H., LI G. & HUANG Q. « LAMP: a database linking antimicrobial peptides ». *PloS one* (2013). Vol. 8, n°6, p. e66557.
139. DUBOS R. J. « Studies on a bactericidal agent extracted from a soil bacillus: II. Protective effect of the bactericidal agent against experimental Pneumococcus infections in mice ». *Journal of Experimental Medicine* (1939). Vol. 70, n°1, p. 11-17.
140. DUBOS R. J. & HOTCHKISS R. D. « The production of bactericidal substances by aerobic sporulating bacilli ». *Journal of Experimental Medicine* (1941). Vol. 73, n°5, p. 629-640.
141. HIRSCH J. G. « Phagocytin: a bactericidal substance from polymorphonuclear leucocytes ». *Journal of Experimental Medicine* (1956). Vol. 103, n°5, p. 589-611.
142. ZEYA H. & SPITZNAGEL J. K. « Antibacterial and enzymic basic proteins from leukocyte lysosomes: separation and identification ». *Science* (1963). Vol. 142, n°3595, p. 1085-1087.
143. DAVIES J. & DAVIES D. « Origins and evolution of antibiotic resistance ». *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* (2010). Vol. 74, n°3, p. 417-433.
144. ZHANG L. & GALLO R. L. « Antimicrobial peptides ». *Current Biology* (2016). Vol. 26, n°1, p. R14-R19. Identifiant DOI[®] 10.1016/j.cub.2015.11.017.
145. ZASLOFF M. « Antimicrobial peptides of multicellular organisms ». *nature* (2002). Vol. 415, n°6870, p. 389.
146. SCHAUBER J. & GALLO R. L. « Antimicrobial peptides and the skin immune defense system ». *Journal of Allergy and Clinical Immunology* (2008). Vol. 122, n°2, p. 261-266.
147. RIEDL S., ZWEYTICK D. & LOHNER K. « Membrane-active host defense peptides—challenges and perspectives for the development of novel anticancer drugs ». *Chemistry and physics of lipids* (2011). Vol. 164, n°8, p. 766-781.
148. RADEK K. & GALLO R. « Antimicrobial peptides: natural effectors of the innate immune system ». In : *Seminars in immunopathology*. Springer, 2007. p. 27-43. ISBN : 1863-2297.
149. MARTÍNEZ B., RODRÍGUEZ A. & SUÁREZ E. « Antimicrobial peptides produced by bacteria: the bacteriocins ». In : *New weapons to control bacterial growth* Springer, 2016. p. 15-38.
150. MARÓTI G., KERESZT A., KONDOROSI E. & MERGAERT P. « Natural roles of antimicrobial peptides in microbes, plants and animals ». *Research in microbiology* (2011). Vol. 162, n°4, p. 363-374.
151. MUNIZ L. R., KNOSP C. & YERETSSIAN G. « Intestinal antimicrobial peptides during homeostasis, infection, and disease ». *Frontiers in immunology* (2012). Vol. 3, p. 310.

152. YOUNT N. Y., BAYER A. S., XIONG Y. Q. & YEAMAN M. R. « Advances in antimicrobial peptide immunobiology ». *Peptide Science: Original Research on Biomolecules* (2006). Vol. 84, n°5, p. 435-458.
153. ZASLOFF M. « Antimicrobial Peptides of Multicellular Organisms: My Perspective ». *In : Antimicrobial Peptides* Springer, 2019. p. 3-6.
154. DE SMET K. & CONTRERAS R. « Human antimicrobial peptides: defensins, cathelicidins and histatins ». *Biotechnology letters* (2005). Vol. 27, n°18, p. 1337-1347.
155. BROGDEN K. A., ACKERMANN M. & HUTTNER K. M. « Small, anionic, and charge-neutralizing propeptide fragments of zymogens are antimicrobial. ». *Antimicrobial agents and chemotherapy* (1997). Vol. 41, n°7, p. 1615-1617.
156. LAI R., LIU H., LEE W. H. & ZHANG Y. « An anionic antimicrobial peptide from toad *Bombina maxima* ». *Biochemical and biophysical research communications* (2002). Vol. 295, n°4, p. 796-799.
157. STEFFEN H., RIEG S., WIEDEMANN I., KALBACHER H., DEEG M., SAHL H.-G., PESCHEL A., GÖTZ F., GARBE C. & SCHITTEK B. « Naturally processed dermcidin-derived peptides do not permeabilize bacterial membranes and kill microorganisms irrespective of their charge ». *Antimicrobial agents and chemotherapy* (2006). Vol. 50, n°8, p. 2608-2620.
158. BESSALLE R., HAAS H., GORIA A., SHALIT I. & FRIDKIN M. « Augmentation of the antibacterial activity of magainin by positive-charge chain extension. ». *Antimicrobial agents and chemotherapy* (1992). Vol. 36, n°2, p. 313-317.
159. HANCOCK R. E. « Peptide antibiotics ». *The Lancet* (1997). Vol. 349, n°9049, p. 418-422.
160. ANUNTHAWAN T., DE LA FUENTE-NÚÑEZ C., HANCOCK R. E. & KLAYNONGSRUANG S. « Cationic amphipathic peptides KT2 and RT2 are taken up into bacterial cells and kill planktonic and biofilm bacteria ». *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes* (2015). Vol. 1848, n°6, p. 1352-1358.
161. MALANOVIC N. & LOHNER K. « Gram-positive bacterial cell envelopes: The impact on the activity of antimicrobial peptides ». *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes* (2016). Vol. 1858, n°5, p. 936-946.
162. CHENG J. T., HALE J. D., ELLIOTT M., HANCOCK R. E. & STRAUS S. K. « The importance of bacterial membrane composition in the structure and function of aurein 2.2 and selected variants ». *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes* (2011). Vol. 1808, n°3, p. 622-633.
163. ANONYME. « Bruce Alberts, Alexander Johnson, Julian Lewis, Martin Raff, Keith Roberts, and Peter Walter. *Molecular biology of the cell* ». (2008).
164. ROTHMAN J. E. & KENNEDY E. P. « Rapid transmembrane movement of newly synthesized phospholipids during membrane assembly ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* (1977). Vol. 74, n°5, p. 1821-1825.
165. BEISSWENGER C. & BALS R. « Functions of antimicrobial peptides in host defense and immunity ». *Current Protein and Peptide Science* (2005). Vol. 6, n°3, p. 255-264.
166. GORR S. « Antimicrobial peptides of the oral cavity ». *Periodontology 2000* (2009). Vol. 51, n°1, p. 152-180.
167. GORR S. & ABDOLHOSSEINI M. « Antimicrobial peptides and periodontal disease ». *Journal of clinical periodontology* (2011). Vol. 38, p. 126-141.

168. BECHINGER B. « The SMART model: soft membranes adapt and respond, also transiently, in the presence of antimicrobial peptides ». *Journal of Peptide Science* (2015). Vol. 21, n°5, p. 346-355.
169. OPPENHEIM F., XU T., MCMILLIAN F., LEVITZ S., DIAMOND R., OFFNER G. & TROXLER R. « Histatins, a novel family of histidine-rich proteins in human parotid secretion. Isolation, characterization, primary structure, and fungistatic effects on *Candida albicans*. ». *Journal of Biological Chemistry* (1988). Vol. 263, n°16, p. 7472-7477.
170. AHMAD M., PILUDU M., OPPENHEIM F. G., HELMERHORST E. J. & HAND A. R. « Immunocytochemical localization of histatins in human salivary glands ». *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* (2004). Vol. 52, n°3, p. 361-370.
171. MACKAY B. J., DENEPITIYA L., IACONO V., KROST S. & POLLOCK J. « Growth-inhibitory and bactericidal effects of human parotid salivary histidine-rich polypeptides on *Streptococcus mutans*. ». *Infection and immunity* (1984). Vol. 44, n°3, p. 695-701.
172. NISHIKATA M., KANEHIRA T., OH H., TANI H., TAZAKI M. & KUBOKI Y. « Salivary histatin as an inhibitor of a protease produced by the oral bacterium *Bacteroides gingivalis* ». *Biochemical and biophysical research communications* (1991). Vol. 174, n°2, p. 625-630.
173. GUSMAN H., TRAVIS J., HELMERHORST E. J., POTEPA J., TROXLER R. F. & OPPENHEIM F. G. « Salivary histatin 5 is an inhibitor of both host and bacterial enzymes implicated in periodontal disease ». *Infection and immunity* (2001). Vol. 69, n°3, p. 1402-1408.
174. XU T., LEVITZ S., DIAMOND R. & OPPENHEIM F. « Anticandidal activity of major human salivary histatins. ». *Infection and immunity* (1991). Vol. 59, n°8, p. 2549-2554.
175. LI X. S., REDDY M. S., BAEV D. & EDGERTON M. « *Candida albicans* Ssa1/2p is the cell envelope binding protein for human salivary histatin 5 ». *Journal of Biological Chemistry* (2003). Vol. 278, n°31, p. 28553-28561.
176. LI X. S., SUN J. N., OKAMOTO-SHIBAYAMA K. & EDGERTON M. « *Candida albicans* cell wall ssa proteins bind and facilitate import of salivary histatin 5 required for toxicity ». *Journal of Biological Chemistry* (2006). Vol. 281, n°32, p. 22453-22463.
177. GROGAN J., MCKNIGHT C. J., TROXLER R. F. & OPPENHEIM F. G. « Zinc and copper bind to unique sites of histatin 5 ». *FEBS letters* (2001). Vol. 491, n°1-2, p. 76-80.
178. MELINO S., GALLO M., TROTTA E., MONDELLO F., PACI M. & PETRUZZELLI R. « Metal-binding and nuclease activity of an antimicrobial peptide analogue of the salivary histatin 5 ». *Biochemistry* (2006). Vol. 45, n°51, p. 15373-15383.
179. KOPRIVNJAK T. & PESCHEL A. « Bacterial resistance mechanisms against host defense peptides ». *Cellular and Molecular Life Sciences* (2011). Vol. 68, n°13, p. 2243-2254.
180. COLE J. N. & NIZET V. « Bacterial evasion of host antimicrobial peptide defenses ». *Microbiology spectrum* (2016). Vol. 4, n°1,.
181. OLSEN I. & POTEPA J. « Strategies for the inhibition of gingipains for the potential treatment of periodontitis and associated systemic diseases ». *Journal of oral microbiology* (2014). Vol. 6, n°1, p. 24800.
182. FALCIANI C., LOZZI L., POLLINI S., LUCA V., CARNICELLI V., BRUNETTI J., LELLI B., BINDI S., SCALI S. & DI GIULIO A. « Isomerization of an antimicrobial peptide broadens antimicrobial spectrum to gram-positive bacterial pathogens ». *PLoS One* (2012). Vol. 7, n°10, p. e46259.

183. HIRT H. & GORR S.-U. « Antimicrobial peptide GL13K is effective in reducing biofilms of *Pseudomonas aeruginosa* ». *Antimicrobial agents and chemotherapy* (2013). Vol. 57, n°10, p. 4903-4910.
184. DE LA FUENTE-NÚÑEZ C., REFFUVEILLE F., MANSOUR S. C., RECKSEIDLER-ZENTENO S. L., HERNÁNDEZ D., BRACKMAN G., COENYE T. & HANCOCK R. E. « D-enantiomeric peptides that eradicate wild-type and multidrug-resistant biofilms and protect against lethal *Pseudomonas aeruginosa* infections ». *Chemistry & biology* (2015). Vol. 22, n°2, p. 196-205.
185. SIMANSKI M., RADEMACHER F., SCHRÖDER L., SCHUMACHER H. M., GLÄSER R. & HARDER J. « IL-17A and IFN- γ synergistically induce RNase 7 expression via STAT3 in primary keratinocytes ». *PloS one* (2013). Vol. 8, n°3, p. e59531.
186. JAIN S. & DARVEAU R. P. « Contribution of *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide to periodontitis ». *Periodontology 2000* (2010). Vol. 54, n°1, p. 53-70.
187. KUMAR P., KIZHAKKEDATHU J. & STRAUS S. « Antimicrobial peptides: Diversity, mechanism of action and strategies to improve the activity and biocompatibility in vivo ». *Biomolecules* (2018). Vol. 8, n°1, p. 4.
188. BRANDENBURG L.-O., MERRES J., ALBRECHT L.-J., VAROGA D. & PUFE T. « Antimicrobial peptides: multifunctional drugs for different applications ». *Polymers* (2012). Vol. 4, n°1, p. 539-560.
189. GHOSH C., SARKAR P., ISSA R. & HALDAR J. « Alternatives to conventional antibiotics in the era of antimicrobial resistance ». *Trends in microbiology* (2019).
190. FRITSCHÉ T. R., RHOMBERG P. R., SADER H. S. & JONES R. N. « Antimicrobial activity of omiganan pentahydrochloride tested against contemporary bacterial pathogens commonly responsible for catheter-associated infections. ». *Journal of Antimicrobial Chemotherapy (JAC)* (2008). Vol. 61, n°5,.
191. SIMONART T. « Newer approaches to the treatment of acne vulgaris ». *American journal of clinical dermatology* (2012). Vol. 13, n°6, p. 357-364.
192. STECKBECK J. D., DESLOUCHES B. & MONTELARO R. C. « Antimicrobial peptides: new drugs for bad bugs? ». (2014).
193. GORDON Y. J., HUANG L. C., ROMANOWSKI E. G., YATES K. A., PROSKE R. J. & MCDERMOTT A. M. « Human cathelicidin (LL-37), a multifunctional peptide, is expressed by ocular surface epithelia and has potent antibacterial and antiviral activity ». *Current eye research* (2005). Vol. 30, n°5, p. 385-394.
194. MANNIS M. J. « The use of antimicrobial peptides in ophthalmology: an experimental study in corneal preservation and the management of bacterial keratitis. ». *Transactions of the American Ophthalmological Society* (2002). Vol. 100, p. 243.
195. NA D. H., FARAJ J., CAPAN Y., LEUNG K. P. & DELUCA P. P. « Stability of antimicrobial decapeptide (KSL) and its analogues for delivery in the oral cavity ». *Pharmaceutical research* (2007). Vol. 24, n°8, p. 1544-1550.
196. SEMLALI A., LEUNG K., CURT S. & ROUABHIA M. « Antimicrobial decapeptide KSL-W attenuates *Candida albicans* virulence by modulating its effects on Toll-like receptor, human β -defensin, and cytokine expression by engineered human oral mucosa ». *Peptides* (2011). Vol. 32, n°5, p. 859-867.
197. LIU Y., WANG L., ZHOU X., HU S., ZHANG S. & WU H. « Effect of the antimicrobial decapeptide KSL on the growth of oral pathogens and *Streptococcus mutans* biofilm ». *International journal of antimicrobial agents* (2011). Vol. 37, n°1, p. 33-38.

198. FARAJ J. A., DORATI R., SCHOUBBEN A., WORTHEN D., SELMIN F., CAPAN Y., LEUNG K. & DELUCA P. P. « Development of a peptide-containing chewing gum as a sustained release antiplaque antimicrobial delivery system ». *Aaps Pharmscitech* (2007). Vol. 8, n°1, p. E177-E185.
199. AL-GHANANEEM A. M., LEUNG K. P., FARAJ J. & DELUCA P. P. « Development of a sustained antiplaque and antimicrobial chewing gum of a decapeptide ». *AAPS PharmSciTech* (2017). Vol. 18, n°6, p. 2240-2247.
200. LI Y., NA R., WANG X., LIU H., ZHAO L., SUN X., MA G. & CUI F. « Fabrication of antimicrobial peptide-loaded PLGA/chitosan composite microspheres for long-acting bacterial resistance ». *Molecules* (2017). Vol. 22, n°10, p. 1637.
201. DE FREITAS LIMA S. M., DE PÁDUA G. M., DA COSTA SOUSA M. G., DE SOUZA FREIRE M., FRANCO O. L. & REZENDE T. M. B. « Antimicrobial peptide-based treatment for endodontic infections—Biotechnological innovation in endodontics ». *Biotechnology advances* (2015). Vol. 33, n°1, p. 203-213.
202. KAJIYA M., SHIBA H., KOMATSUZAWA H., OUHARA K., FUJITA T., TAKEDA K., UCHIDA Y., MIZUNO N., KAWAGUCHI H. & KURIHARA H. « The antimicrobial peptide LL37 induces the migration of human pulp cells: a possible adjunct for regenerative endodontics ». *Journal of endodontics* (2010). Vol. 36, n°6, p. 1009-1013.
203. OUHARA K., KOMATSUZAWA H., YAMADA S., SHIBA H., FUJIWARA T., OHARA M., SAYAMA K., HASHIMOTO K., KURIHARA H. & SUGAI M. « Susceptibilities of periodontopathogenic and cariogenic bacteria to antibacterial peptides, β -defensins and LL37, produced by human epithelial cells ». *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* (2005). Vol. 55, n°6, p. 888-896.
204. WINFRED S. B., MEIYAZAGAN G., PANDA J. J., NAGENDRABABU V., DEIVANAYAGAM K., CHAUHAN V. S. & VENKATRAMAN G. « Antimicrobial activity of cationic peptides in endodontic procedures ». *European journal of dentistry* (2014). Vol. 8, n°2, p. 254.
205. AKKOUCH A., ZHANG Z. & ROUABHIA M. « Engineering bone tissue using human dental pulp stem cells and an osteogenic collagen-hydroxyapatite-poly (l-lactide-co- ϵ -caprolactone) scaffold ». *Journal of biomaterials applications* (2014). Vol. 28, n°6, p. 922-936.
206. HONG S. Y., OH J. E., YUN KWON M., CHOI M. J., LEE J. H., LEE B. L., MOON H. M. & LEE K. H. « Identification and characterization of novel antimicrobial decapeptides generated by combinatorial chemistry ». *Antimicrobial agents and chemotherapy* (1998). Vol. 42, n°10, p. 2534-2541.
207. ALHARBI I. & ROUABHIA M. « Repeated exposure to whole cigarette smoke promotes primary human gingival epithelial cell growth and modulates keratin expression ». *Journal of periodontal research* (2016). Vol. 51, n°5, p. 630-638.
208. LIANG C.-C., PARK A. Y. & GUAN J.-L. « In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro ». *Nature protocols* (2007). Vol. 2, n°2, p. 329.
209. PALLASCH T. « Global antibiotic resistance and its impact on the dental community. ». *Journal of the New Jersey Dental Association* (2000). Vol. 71, n°2, p. 14-5.
210. SIQUEIRA JR J. F. & RÔÇAS I. N. « Present status and future directions in endodontic microbiology ». *Endodontic topics* (2014). Vol. 30, n°1, p. 3-22.
211. POVEDA RODA R., BAGÁN J. V., SANCHIS BIELSA J. M. & CARBONELL PASTOR E. « Antibiotic use in dental practice: A review ». *Medicina Oral, Patología Oral y Cirugía Bucal (Internet)* (2007). Vol. 12, n°3, p. 186-192.

212. SEGURA-EGEA J., GOULD K., ŞEN B. H., JONASSON P., COTTI E., MAZZONI A., SUNAY H., TJÄDERHANE L. & DUMMER P. « Antibiotics in Endodontics: a review ». *International endodontic journal* (2017). Vol. 50, n°12, p. 1169-1184.
213. FOUAD A., BYRNE B., DIOGENES A., SEDGLEY C. & CHA B. « AAE Guidance on the Use of Systemic Antibiotics in Endodontics ». *Association of Endodontists Position Statement* (2017). p. 1-8.
214. MATTHEWS D. C., SUTHERLAND S. & BASRANI B. « Emergency management of acute apical abscesses in the permanent dentition: a systematic review of the literature ». *Journal-Canadian Dental Association* (2003). Vol. 69, n°10, p. 660-661.
215. KÖNIG C., SIMMEN H. & BLASER J. « Bacterial concentrations in pus and infected peritoneal fluid—implications for bactericidal activity of antibiotics. ». *The Journal of antimicrobial chemotherapy* (1998). Vol. 42, n°2, p. 227-232.
216. ABBOTT P. V. « Selective and intelligent use of antibiotics in endodontics ». *Australian Endodontic Journal* (2000). Vol. 26, n°1, p. 30-39.
217. POORNI S., SRINIVASAN M. R., DURAIVEL D., MAHENDRA L. & PREMKUMARI S. « Treatment outcome with a revascularization protocol using double and triple antibiotic pastes in immature necrotic teeth—A double blinded randomized control clinical trial ». *Journal of Pierre Fauchard Academy (India Section)* (2017). Vol. 31, n°1, p. 1-8.
218. BALASUBRAMANIAM R. & JAYAKUMAR S. « Antibiotics in endodontics—A concise review ». *Int J of Applied Dental Science* (2017). Vol. 3, n°4, p. 323-329.
219. BYSTRÖM A., CLAESSESON R. & SUNDQVIST G. « The antibacterial effect of camphorated paramonochlorophenol, camphorated phenol and calcium hydroxide in the treatment of infected root canals ». *Dental Traumatology* (1985). Vol. 1, n°5, p. 170-175.
220. FAVA L. & SAUNDERS W. « Calcium hydroxide pastes: classification and clinical indications ». *International endodontic journal* (1999). Vol. 32, n°4, p. 257-282.
221. FARHAD A. & MOHAMMADI Z. « Calcium hydroxide: a review ». *International dental journal* (2005). Vol. 55, n°5, p. 293-301.
222. HANCOCK R. E. & CHAPPLE D. S. « Peptide antibiotics ». *Antimicrobial agents and chemotherapy* (1999). Vol. 43, n°6, p. 1317-1323.