

## SHORT COMMUNICATION

### SC10 - DENTAL PULP STEM CELLS ADHESION ON SURFACE-MODIFIED POROUS SILICON: TOWARDS A SCAFFOLD FOR REGENERATIVE MEDICINE

PY Collart Dutilleul<sup>1</sup>, E Secret<sup>2</sup>, I Panayotov<sup>1</sup>, C Gergely<sup>3</sup>, F Cunin<sup>2</sup>, F Cuisinier<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratoire Biosanté Nanoscience EA 4203, Université Montpellier, 545 Av Pr JL Viala 34193 Montpellier, France. <sup>2</sup>Matériaux Avancés pour la Catalyse et la Santé UMR 5253 CNRS, Institut Charles Gerhardt, 104 rue de la Galéra 34000 Montpellier, France. <sup>3</sup>Groupement d'Etude des Semiconducteurs UMR 5650 CNRS, Université Montpellier2, Place Eugène Bataillon 34095 Montpellier, France.

#### KEY WORDS

Dental Pulp Stem Cell, Porous Silicon, Biocompatibility, Bioresorbable

#### INTRODUCTION

The multifunctionality of Dental Pulp Stem Cells (DPSC), able to differentiate in different lineages, has already been demonstrated *in vitro* and *in vivo*. However, scaffolds are often needed for tissue engineering. Porous silicon (pSi) is a promising biomaterial that is non-toxic and biodegradable. Surface modifications can offer control over the degradation rate and can also impart properties that promote cell adhesion. The main advantage of pSi over other biomaterials is its ability to degrade, in aqueous solutions, into non-toxic silicic acid (2-3). Coupling the capacities of DPSC with the pSi properties is a promising tool in regenerative medicine. We study here the adhesion, proliferation and morphology of DPSC on different surface-modified pSi.

#### MATERIALS AND METHODS

P-type silicon wafers (3–6Ωcm resistivity) were etched in a custom-made Teflon cell at a constant current density of either 30 mA/cm<sup>2</sup> for 10 min or 300 mA/cm<sup>2</sup> for 2 min 15 sec, in a 25% fluorhydric acid (HF) solution in ethanol. The pSi samples were either oxidized at 800°C for 1 hour or hydrosilized with undecenoic acid. The wafers were then cut into 1 cm<sup>2</sup> pieces. Before use for cell culture, the wafers were sterilized with 70% ethanol for 10 min. The topography of surface modified pSi samples was analysed by means of scanning

electronic microscope (SEM) (Analytic FEI Quanta FEG 200) and water contact angle measurement (custom-made set-up; contact angle measurement with ImageJ software).

Human dental pulp cells were collected from teeth of healthy adults following an already described protocol (1). These cells were incubated in αMEM-10%FBS at 37°C in 5% CO<sub>2</sub> atmosphere in a humidified incubator and the medium was changed twice a week. After 3 weeks, cells were analyzed by flow cytometry using mouse anti-human CD34-PE and CD146-FITC. These cells were then incubated in αMEM on pSi samples for either 4 hours or 24 hours at 37°C in 5% CO<sub>2</sub>. To determine cellular morphology and viability on the surface, cells were stained with fluorescein diacetate (FDA) and incubated for 5 min at 37°C, before being observed under fluorescence microscopy at excitation wavelengths of 450–490nm (2). Cell proliferation was measured via quantification of acid phosphatase activity for both living and proliferating cells: yellow colorimetric reaction was measured by a microtiter plate reader at 405nm (4). A 24 well cell culture plate is used as positive control.

#### RESULTS

As contact angle measurements on pSi cannot be directly compared with measurements taken on flat surfaces, wettability of the surfaces was compared amongst our different samples. Freshly etched pSi is known to be hydrophobic. After oxidation or hydrosilylation, at either 30 or 300 mA/cm<sup>2</sup>, pSi wafers be-

came clearly hydrophilic:  $19^{\circ}\pm 3$  and  $12^{\circ}\pm 3$  for ozone oxidation (respectively 30 and  $300\text{mA}/\text{cm}^2$ );  $57^{\circ}\pm 6$  and  $43^{\circ}\pm 5$  for hydrosililation (respectively 30 and  $300\text{mA}/\text{cm}^2$ ). SEM revealed a highly porous surface, with a mean size of pore of  $10\text{nm}\pm 2$  for  $30\text{mA}/\text{cm}^2$ , and  $21\text{nm}\pm 3$  for  $300\text{mA}/\text{cm}^2$  (Fig.1)  
 Flow cytometry analysis revealed that cells were 17% CD34+ and 77% CD146+ (Fig.2). Results of cell adhesion on pSi samples with colorimetric assay are presented in Figure 3: at 4 hours and 24 hours, samples etched with  $300\text{mA}/\text{cm}^2$  tend to offer a better adhesion for cells; the same tendency is observed for hydrosililation treatment. However, no significant difference can be seen. Cells adhere significantly more on culture plate. FDA staining didn't reveal any difference between pSi samples, but showed that cell presented the same morphology on pSi as on culture plate (Fig.4)

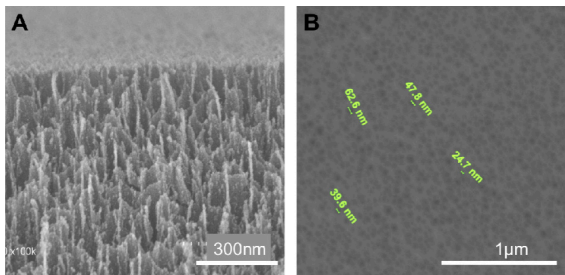


Figure 1: SEM observation of pSi surface. Image A shows the roughness of pSi surface, magnification x250000. Image B shows the size of pores, magnification x10000

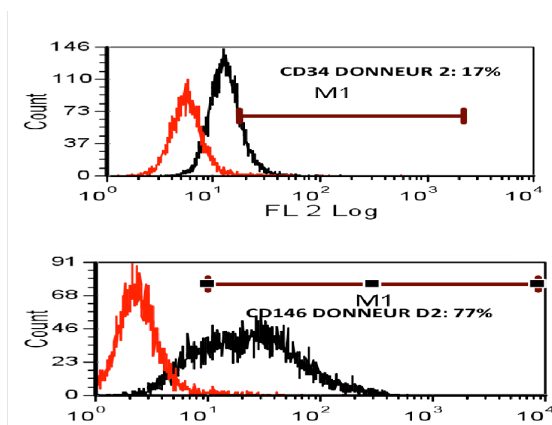


Figure 2: Flow cytometry analysis of dental pulp cells after 3 weeks of culture in appropriate conditions. Cells appear to be 17% CD34+ and 77% CD146+.

Figure 3: Cell adhesion on pSi, at 4H and 24H. Red is positive control, Green  $30\text{mA}/\text{cm}^2$  Oxidized, Violet  $300\text{mA}/\text{cm}^2$  Oxidized, Blue  $30\text{mA}/\text{cm}^2$  Hydrosililized, Orange  $300\text{mA}/\text{cm}^2$  Hydrosililized. Error bar for  $p=0.05$

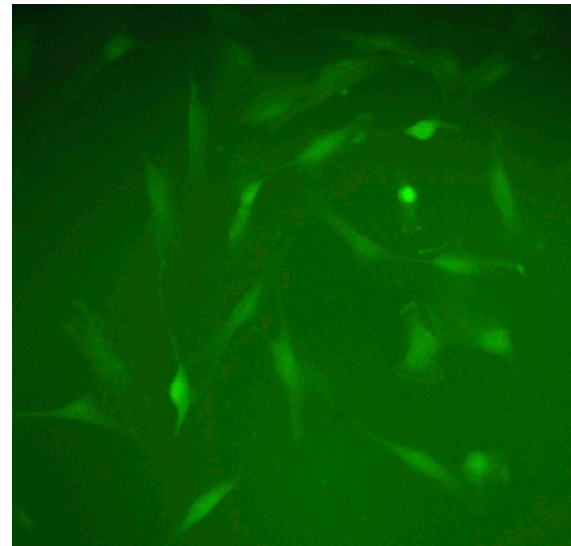
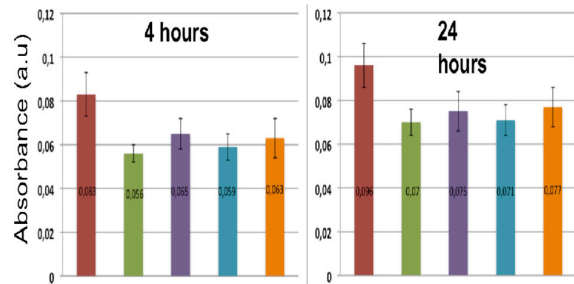


Figure 4: FDA staining of dental pulp stem cells on pSi

## DISCUSSION

Surface modification, by turning pSi from hydrophobic to hydrophilic, allows cell adhesion and growth. The two tested sizes of pore were similar for cell adhesion. In the same way, the two tested surface treatments allowed adhesion of DPSC. And cell morphology on pSi was very similar to culture plates. A significant advantage of pSi is its ability to degrade into non-toxic products, and its resorption time is influenced by surface modification. Thus, pSi is a scaffold fitting for DPSC and that can be resorbable as necessary. In addition, the tunable size of pore might permit to incorporate inside the scaffold different molecules, such as growth factors or nutriment.

## REFERENCES

1. d'Aquino R et al. (2007) Cell Death Differ, 14 (6), 1162-1171.
2. Low SP et al. (2006) Biomaterials, 27 (26), 4538-4546.
3. Low SP et al. (2009) Biomaterials, 30 (15), 2873-2880.
4. Werner S et al. (2009) Biomaterials, 30 (12), 2291-2301.

## SHORT COMMUNICATION

### SC10 - ADHÉSION DE CELLULES SOUCHES PULPAIRES SUR DU SILICIUM POREUX : UN POSSIBLE SUPPORT POUR LA MÉDECINE RÉGÉNÉRATIVE

PY Collart Dutilleul<sup>1</sup>, E Secret<sup>2</sup>, I Panayotov<sup>1</sup>, C Gergely<sup>3</sup>, F Cunin<sup>2</sup>, F Cuisinier<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratoire Biosanté Nanoscience EA 4203, Université Montpellier1, 545 Av Pr JL Viala 34193 Montpellier, France. <sup>2</sup>Matériaux Avancés pour la Catalyse et la Santé UMR 5253 CNRS, Institut Charles Gerhardt, 104 rue de la Galéra 34000 Montpellier, France. <sup>3</sup>Groupement d'Etude des Semiconducteurs UMR 5650 CNRS, Université Montpellier2, Place Eugène Bataillon 34095 Montpellier, France.

#### KEY WORDS

Cellule souche pulpaire, Silicium poreux, Biocompatibilité, Biorésorbable.

#### INTRODUCTION

La pluripotentialité des cellules souches pulpaires (DPSC) a déjà été démontrée *in vitro* et *in vivo*. Cependant, un support implantable est souvent nécessaire pour l'ingénierie tissulaire. Le silicium poreux (pSi) est un biomatériau prometteur, non-toxique et biorésorbable. Des modifications de surface du pSi permettent de contrôler sa vitesse de dégradation et peuvent également donner des propriétés favorisant l'adhésion cellulaire. L'avantage principal du pSi par rapport aux autres biomatériaux est sa capacité à se dégrader, en milieu aqueux, en acide silicique, qui est naturellement produit par l'organisme (2-3). Regrouper les capacités de prolifération et de différenciation des DPSC avec le pSi offre des perspectives intéressantes en médecine régénératrice. Nous étudions ici l'adhésion, la prolifération et la morphologie des DPSC sur différentes surfaces modifiées de pSi.

#### MATÉRIEL ET MÉTHODES

Des tranches de p-type silicium (3–6Ωcm résistivité) ont été gravées avec un courant continu de 30mA/cm<sup>2</sup> pendant 10 min ou 300mA/cm<sup>2</sup> pendant 2 min 15 sec, dans une solution à 25% d'acide fluorhydrique dans de l'éthanol. Les échantillons de pSi ont ensuite été soit oxydés à 800°C pendant 1H soit hydrosililés à l'acide undécénoïque. Avant mise en culture cellulaire, les échantillons ont été stéri-

lisés dans de l'éthanol à 70% pendant 10min. La topographie des surfaces modifiées de pSi a été analysée au microscope électronique à balayage (SEM) (Analytic FEI Quanta FEG 200) et avec des mesures d'angles de contact (WCA water contact angle) à l'aide d'un dispositif créé au laboratoire, et avec le logiciel ImageJ.

Les cellules de pulpe dentaire humaine ont été collectées à partir de dents d'adultes en bonne santé, selon un protocole déjà établi (1). Ces cellules ont été incubées dans un milieu de culture αMEM-10%FBS à 37°C dans une atmosphère humide contenant 5% de CO<sub>2</sub>. Après 3 semaines, ces cellules ont été analysées par cytométrie en flux, en utilisant des anticorps de souris anti-humains : CD34-PE et CD1146-FITC. Ces cellules ont alors été incubées dans de l'αMEM durant 4 heures ou durant 24 heures sur les échantillons de pSi, à 37°C. La morphologie cellulaire a été déterminée par coloration à la fluorescéine diacétate (FDA). Après 5 min d'incubation à 37°C, les cellules sur le pSi ont été observées en microscopie à fluorescence, à une longueur d'onde d'excitation 450-490nm (2). La prolifération cellulaire a été mesurée par la quantification de l'activité de la phosphatase acide : la réaction colorimétrique a été mesurée par un lecteur de plaque à 405nm (4). Une plaque de culture 24 puits a servi de contrôle positif.

#### RESULTATS

Nous avons comparé la mouillabilité des diffé-

rents échantillons. Le pSi fraîchement gravé est hydrophobique. Après oxydation ou hydrosililation, à 30 ou 300 mA/cm<sup>2</sup>, les échantillons deviennent hydrophiles : 19°±3 and 12°±3 pour l'oxydation (respectivement 30 et 300mA/cm<sup>2</sup>); 57°±6 and 43°±5 pour l'hydrosililation (respectivement 30 et 300mA/cm<sup>2</sup>). La microscopie électronique à balayage (SEM) a montré une surface hautement poreuse, avec une taille moyenne de pore de 10nm±2 pour 30mA/cm<sup>2</sup>, et 21nm±3 pour 300mA/cm<sup>2</sup> (Fig.1). Les résultats de l'adhésion cellulaire sur le pSi sont présentés sur la figure 3 : à 4H et à 24H, les échantillons gravés à 300mA/cm<sup>2</sup> tendent à montrer une meilleure adhésion; la même tendance est observée pour le traitement par hydrosililation. Cependant aucune différence significative n'est relevée. Les cellules adhèrent significativement plus sur les plaques de culture. La coloration au FDA ne révèle pas de différence entre les différents échantillons de pSi, mais montre des cellules qui ayant la même morphologie sur le pSi et sur les plaques de culture (Fig.4).

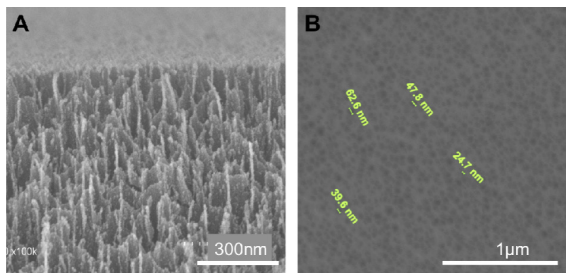


Figure 1: SEM surface de pSi. L'image A montre la rugosité du pSi, grossissement x250000. L'image B montre la taille de pores, grossissement x100000.

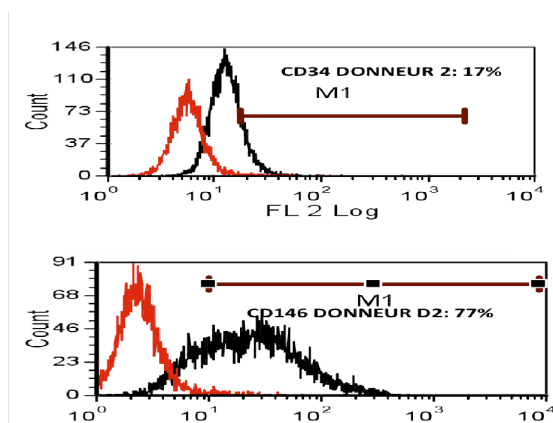


Figure 2: Cytométrie en flux cellules pulpaire après 3 semaines de culture. Les cellules se révèlent 17% CD34+ and 77% CD146+

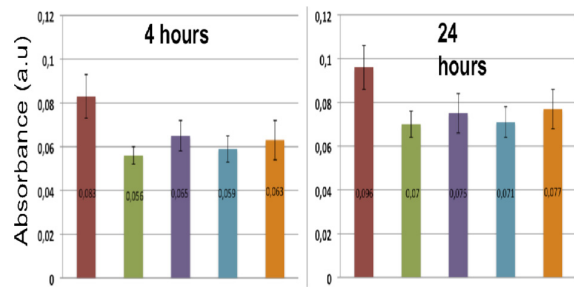


Figure 3: Adhésion cellulaire sur pSi, à 4H et 24H. En rouge, contrôle positif, Vert 30mA/cm<sup>2</sup> Oxydé, Violet 300mA/cm<sup>2</sup> Oxydé, Bleu 30mA/cm<sup>2</sup> Hydrosililé, Orange 300mA/cm<sup>2</sup> Hydrosililé. Barre d'erreur p=0.05

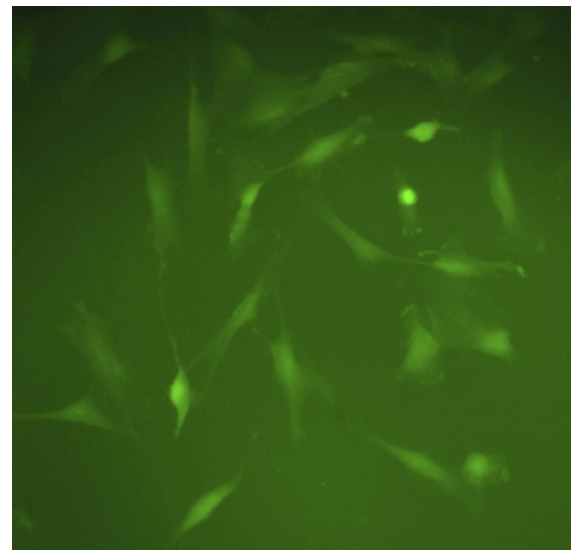


Figure 4: Coloration au FDA de DPSC sur support de pSi

## Discussion

Les modifications de surface, en rendant le pSi hydrophile, permettent l'adhésion et la croissance cellulaire. Les 2 tailles de pores testées permettent une adhésion cellulaire similaire. De même, les 2 traitements de surface testés permettent l'adhésion des DPSC. Et la morphologie cellulaire sur le pSi est très similaire à celle observée en culture classique. Un des avantages majeurs du pSi est sa capacité de dégradation, et son temps de résorption est directement influencé par le traitement de surface effectué. Ainsi, le pSi est un support adapté pour les DPSC et son temps de résorption peut être adapté à l'objectif thérapeutique. De plus, la variabilité de la taille des pores permet d'envisager l'incorporation de diverses molécules telles que des facteurs de croissance ou des nutriments.

**References**

1. d'Aquino R et al. (2007) *Cell Death Differ*, 14 (6), 1162-1171.
2. Low SP et al. (2006) *Biomaterials*, 27 (26), 4538-4546.
3. Low SP et al. (2009) *Biomaterials*, 30 (15), 2873-2880.
4. Werner S et al. (2009) *Biomaterials*, 30 (12), 2291-2301.