Reçu le 04 01 2023; 05 04 2023

ÉTUDE EXPÉRIMENTALE SUR L'IMPLICATION DES FIBROBLASTES GINGIVAUX ET LE PROCESSUS DE MINÉRALISATION ECTOPIQUE DANS LE SYNDROME EMAIL-REIN

EXPERIMENTAL STUDY ON THE INVOLVEMENT OF GINGIVAL FIBROBLASTS AND THE ECTOPIC MINERALIZATION PROCESS IN ENAMEL-RENAL SYNDROME

DIARRA A[1,2]*, DIALLO AM,[3] ESSAMA ENO BL[4], KANÉ AST[5], MILLOGO M[1,2]

1. *Unité de Formation et de Recherche en Sciences de la Santé (UFR/SDS), Université Ouaga I Pr Joseph Ki-Zerbo, 03 BP 7021 Ouagadougou 03, Burkina Faso.*
2. *Centre Hospitalier Universitaire de Tengandogo, 11BP :104 Ouagadougou CMS 11, Burkina Faso.*
3. *Service de Parodontologie, Département d'Odontologie et de Stomatologie, Faculté de Médecine, Pharmacie et d'Odontologie-Stomatologie, Université Cheikh Anta Diop, Dakar, Sénégal.*
4. *Faculté de Médecine et des Sciences Pharmaceutiques, Université de Douala Cameroun*
5. *Service d'Odontologie, Infirmerie Hôpital de Bamako (Mali)*

Correspondance : Dr Abdoulaziz DIARRA
Unité de Formation et de Recherche en Sciences de la Santé (UFR/SDS), Section Dentaire
Université Ouaga I Pr Joseph Ki Zerbo 03 BP 7021 Ouagadougou 03, Burkina Faso.
E-mail: abdoulaziz483@yahoo.fr Tél: +22674015901

RÉSUMÉ

Introduction : les fibroblastes, cellules principales du tissu conjonctif gingival sont impliquées dans plusieurs processus physiopathologiques. Récemment, des calcifications ectopiques gingivales ont été mises en évidence dans le Syndrome Email Rein, sans explication sur le mécanisme physiopathologique aux niveaux cellulaire et moléculaire.

Objectif : l'objectif de ce travail était d'évaluer le rôle des FGs dans le processus de formation des calcifications ectopiques gingivales dans le syndrome émail-rein.

Matériel et méthodes : à partir de déchets biologiques provenant de deux patients (muté et témoin), des explants de gencive ont été mis en culture primaire, puis secondaire dans du DMEM (Dubelcco's Modified Eagle's Medium Invritrogen®). Ensuite, nous avons réalisé une expérimentation sur le processus de minéralisation des fibroblastes gingivaux (FGs) mutés et contrôles, dans trois milieux différents (prolifération, ostéodifférenciation, minéralisant), ainsi qu'une coloration au rouge alizarine pour identifier au microscope à contraste de phase d'éventuelles minéralisations des cellules dans les trois milieux. L'expression des gènes principaux impliqués dans le processus de minéralisation osseuse a également été évaluée par la PCR quantitative et comparée entre les deux groupes cellulaires.

Résultats : malgré la mutation de FAM20A (Family with sequency 20A), les fibroblastes gingivaux conservent un aspect fusiforme. Les résultats montrent, dans le milieu minéralisant, des formations calciques plus importantes (coloration au rouge alizarine à J28), de même qu'une faible expression des marqueurs ostéogéniques en présence des FGs mutés comparés au FGs contrôles.

Conclusion : la mutation de FAM20A semble engendrer une modification des composants matriciels aboutissant à la formation de calcifications ectopiques.

Mots-clés: Culture cellulaire, Fibroblastes gingivaux, Syndrome Email-Rein, FAM20A

ABSTRACT

Introduction: *fibroblasts, the main cells of gingival connective tissue, are involved in several pathophysiological processes. Recently, gingival ectopic calcifications have been demonstrated in Email Rein Syndrome, without explanation of the pathophysiological mechanism at the cellular and molecular levels.*

Objective: *the aim of this work was to evaluate the role of FGs in the process of gingival ectopic calcification formation in enamel-kidney syndrome.*

Material and methods: *using biological waste from two patients (mutated and control), gingival explants were cultured in primary and then secondary cultures in DMEM (Dubelcco's Modified Eagle's Medium Invritrogen®). Then, we performed an experiment on the mineralization process of mutated and control gingival fibroblasts (FGs) in three different media (proliferation, osteodifferentiation, mineralizing), as well as an alizarin red staining to identify with a phase contrast microscope the possible mineralization of cells in the three media. The expression of the main genes involved in the bone mineralization process was also evaluated by quantitative PCR and compared between the two cell groups.*

Results: *despite the FAM20A mutation, gingival fibroblasts retain a fusiform appearance. The results show, in the mineralizing medium, higher calcium formations (alizarin red staining at J28), as well as a low expression of osteogenic markers in the presence of the mutated FGs compared to the control FGs.*

Conclusion: *the mutation of FAM20A seems to cause a modification of the matrix components leading to the formation of ectopic calcifications.*

Key words: Cell Culture, Gingival Fibroblasts, Enamel Renal Syndrome, FAM20A

 © EDUCI 2023

INTRODUCTION

Le syndrome émail-rein est un trouble caractérisé par un schéma autosomique récessif qui est marqué par une grave hypoplasie de l'émail, une calcification intrapulpaire, une éruption dentaire défaillante, une néphrocalcinose et souvent une hyperplasie gingivale ; cette hyperplasie peut être source de retard d'éruption ou d'inclusion dentaire dans les formes sèvères [1].C'est une maladie extrêmement rare. Il est connu par divers syndromes tels que le syndrome d'amélogenèse imparfaite (AI), le syndrome de MacGibbon et le syndrome de Lubinsky-MacGibbon.

Il affecte moins d'une personne sur 100 000 dans la population mondiale. Il a été découvert que la cause de ce syndrome est la mutation du gène FAM20A [2]. Depuis le premier rapport documenté par MacGibbon en 1972, seuls 10 autres cas ont été documentés [3,4]. La culture cellulaire qui permet entre autres l'étude de la fonctionnalité des cellules souches est un important outil utilisé de plus en plus en recherche biomédicale, en bioingénierie et en thérapie cellulaire [5]. Le fibroblaste peut être défini comme étant une cellule du tissu conjonctif d'origine mésenchymateuse qui sécrète des protéines comme le collagène et qui contribue à la formation de la matrice extracellulaire des tissus [6]. Ces cellules issues de la crête neurale, pour ce qui concerne les structures crânio-faciales, possèdent des propriétés spécifiques comme leur facilité d'isolement et leur capacité d'expansion *in vitro* [7].

Les fibroblastes sont les cellules principales du tissu conjonctif gingival. En effet il s'agit de cellules clés impliquées dans l'homéostasie et l'entretien du tissu conjonctif gingival, mais intervenant aussi au cours de plusieurs processus physiopathologiques comme la cicatrisation, l'inflammation, la réparation, le vieillissement, ou encore le cancer [8,9].

Si le rôle des cellules musculaires lisses vasculaires semble bien établi dans les mécanismes phosphocalciques et l'apparition de calcifications au niveau rénal dans l'insuffisance rénale [10], aucune étude ne rapporte l'implication directe des fibroblastes gingivaux (FGs) dans la formation des nodules de calcification dans le tissu conjonctif gingival.

Une étude précédente a mis en évidence des calcifications ectopiques gingivales chez des patients atteints d'ERS [11] ainsi l'objectif de ce présent travail est d'évaluer le rôle des FGs dans le processus de formation des calcifications ectopiques gingivales dans l'ERS.

MATÉRIELS ET MÉTHODES

Il s'agit d'une étude expérimentale réalisée in vitro. Nous avons sélectionné deux patients : un patient malade présentant le syndrome et un autre patient sain qui a servi de témoin. Sur ces deux patients des biopsies gingivales ont été faites et les explants gingivaux prélevés ont été mise en culture dans différents milieux. Ensuite les extractions des gènes clés de la minéralisation osseuse ont été réalisées et une leurs quantifications faites par une analyse par PCR.

CULTURE CELLULAIRE

Biopsie gingivale

Des biopsies gingivales ont été collectées après extraction dentaire chirurgicale sur deux patients (témoin et muté) dans le cadre de leur prise en charge bucco-dentaire. Les patients ont déclaré ne pas avoir ingéré de médicaments pouvant modifier l'homéostasie gingivale ; ils ne présentaient pas de maladie parodontale et ont donné leur accord pour l'expérimentation. Les explants ont ensuite été transportés au laboratoire dans un tube contenant un milieu de culture, du DMEM (Dubelcco'sModified Eagle's Medium Invritrogen®) à température ambiante dans un délai d'une heure.

Isolation et Culture primaire

Les explants de gencive (patients malade et contrôle) ont été mis en culture dans des flasques de 25 cm^2 après avoir été découpés en morceaux de 2 mm^3 et déposés côté conjonctif. Les cellules (particulièrement les fibroblastes gingivaux) migrent ainsi hors de l'explant et colonisent la boîte de pétri. Les flasques étaient remplies de 10 ml de milieu de prolifération à base de DMEM (Tableau I).

Tableau 1 : Composition des différents milieux utilisés lors du processus de différenciation cellulaire des FGs.

Milieu de prolifération (P)	DMEM L-Glutamax (pyruvate) 1g/L glucose. Sérum de Veau Fœtal (SVF) 20%, Pénicilline/Streptomycine 1% Acides Aminés Non Essentiels 1% Amphotéricine B 0.5%
Milieu d'ostéodifférenciation (O)	Milieu de prolifération + Vitamine C 50ug/ml Dexaméthasone 100 nM Vitamine D3 100 nM β-glycérophosphate 20 mM
Milieu de minéralisation (M)	Milieu de prolifération + β-glycérophosphate 20 mM

Les flasques ont ensuite été placées dans un incubateur programmé à 37°C, en atmosphère

 © EDUCI 2023

humide à 5% de CO_2 et le milieu de culture était changé deux fois par semaine jusqu'à confluence des cellules (90% de colonisation obtenue au bout de trois semaines environ).

Culture secondaire

Une fois à confluence, les cellules étaient trypsinisées (Trypsine-EDTA, GIBCO®, 1,5 ml à 0,05%), centrifugées et réensemencées dans des flasques de 25 cm^2 contenant 10 ml de milieu de culture enrichi au Sérum de Veau Fœtal (SVF) 20% jusqu'au 4e passage.

Pour le protocole de prolifération, les cellules ont été comptées sur la lame de malassez et après le 4e passage, 38000 cellules étaient réensemencées dans des boites de 6 puits pour l'expérimentation sur le processus de minéralisation et de comparaison des potentiels de différenciation entre les FGs du patient malade et du patient témoin.

Etude du processus de minéralisation

Une fois à confluence dans les boites de 6 puits, les FGs ont évolué dans trois milieux différents à J0, respectivement un milieu de prolifération classique, un milieu d'ostéodifférenciation et un milieu minéralisant durant quatre semaines. Les milieux étaient renouvelés toutes les 48 à 72h (figure 1 et Tableau I). A la fin de la différenciation à J28, les cellules ont été utilisées pour coloration au rouge alizarine, puis les boites de culture ont été observées au microscope à contraste de phase.

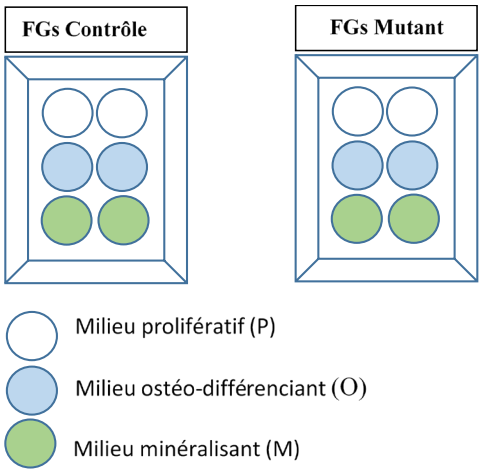

Figure 1: schéma récapitulatif de la méthode expérimentale de culture utilisée avec la répartition des Fibroblastes Gingivaux (FGs) dans les différents milieux utilisés.

ANALYSE DES ARNM

Durant les quatre semaines, quatre temps d'arrêt ont été observés (J7, J14, J21, J28). A chaque temps d'arrêt, nous avons comparé l'expression génétique des principales molécules impliquées dans le processus de minéralisation en analysant les ARNm des deux groupes de cellules (FGs mutés et FGs témoins). La technique de PCR (quantitative Polymerase Chain Reaction) quantitative a été utilisée.

Extraction d'ARN

Nous avons réalisé une extraction d'ARN totaux dans le but d'effectuer ultérieurement une retro transcription (RT) et une PCR quantitative (qPCR). Selon les instructions du fabricant, les cellules ont été reprises dans 1 ml de trizol (TriReagent® Molecular Research Center Inc.) et 200µl de chloroforme ont été rajoutés pour séparer la phase aqueuse contenant les ARN de la phase phénolique obtenue après mixage vigoureux et centrifugation du mélange (12000 tours pendant 15 minutes à 4°C) ; ensuite les ARN ont été précipités par mélange de la phase aqueuse initialement séparée avec 500µl d'isopropanol pendant au moins 15 minutes. Une seconde étape de centrifugation a été réalisée, puis le culot d'ARN ainsi obtenu a été rincé à l'éthanol avant d'être suspendu dans de l'eau RNAse free. L'intégrité des ARN a été observée sur gel d'agarose avant congélation.

Dosage des ARN

La concentration des ARN a été mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre (Qubit® fluorometer) ; après calibration de l'appareil grâce à deux solutions standards, 1µl d'ARN de l'échantillon a été mélangé avec une solution de réactif et de tampon pour déterminer la concentration d'ARN dans chaque échantillon.

Retro-transcription

Une fois extraits, les ARN ont été retro-transcrits en ADN complémentaires (ADNc). Cette étape a été réalisée avec le kit Superscript II RT (Invitrogen®). Une quantité de 1µg d'ARN totaux de chaque échantillon a été utilisée. Une solution de réaction composée d'1µl d'amorces oligo dT et d'1µl de dNTP est rajoutée à 1µg d'ARN et 10 volumes d'eau. L'ensemble est incubé pendant 5 minutes à 65°C, avant d'être replongé immédiatement dans la glace pendant 5 minutes. Un second mélange composé de 4µl Buffer 5X, de 2µl de DTT 0.1M, de 1µl de RNAseout et de 1µl d'enzyme SST II (soit un total de 8 µl) a été

rajouté à chaque échantillon puis l'ensemble a été incubé à 42°C pendant 50 minutes. A la fin de la réaction, l'enzyme est inactivée à 70°C pendant 15 minutes, puis les ADNc ainsi néformés sont congélés à -20°C jusqu'à leur utilisation en qPCR.

PCR quantitative

Le principe de la qPCR repose sur l'utilisation d'ADN polymérase et consiste en la réplication et l'amplification in vitro d'ADNc en ADN double brins. Par ailleurs, cette technique permet d'évaluer le niveau d'expression d'un gène d'intérêt par rapport à un gène de référence dans un échantillon biologique donné. Le taux d'ADN sera détecté en temps réel grâce à la fluorescence émise par un agent intercalant de l'ADN double brin, en l'occurrence le Kappa Sybr utilisé dans notre expérience; l'appareil utilisé était Bio-Rad real-time thermal cyclers CFX96™. L'amplification a été faite en 35 cycles de 3 étapes principales chacune (95° C, 60°C, 72°C). Les différents gènes testés dans nos échantillons étaient les principaux marqueurs de la différenciation osseuse [Runt related transcription factor 2 (Runx2), Ostérix (Osx), Alkaline Phosphatase (ALP), Collagen type1 A1 (COL1 A1)], deux gènes de référence utilisés pour la normalisation des résultats [Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase (GAPDH), Succinate Dehydrogenase complex, Flavoprotein subunit A (SDHA)], Family with sequency 20A (FAM20A) et Bone Morphogenetic Protein2 (BMP2) (Tableau II).

Tableau 2 : Séquences des différents couples d'amorces utilisés lors de la qPCR.

Gènes transcrits	Séquences amorces Forward	Séquences amorces Reverse
GAPDH	GGC-GCT-GAG-TAC-GTC-GTG-GA	GTG-GTG-CAG-GAG-GCA-TTG-CTG-AT
SDHA	AGC-AAG-CTC-TAT-GGA-GAC-CT	TAA-TCG-TAC-TCA-TCA-ATC-CG
RUNX2	CCG-GAA-TGC-CTC-TGC-TGT-TA	TGT-CTG-TGC-CTT-CTG-GGT-TC
OSX	ACT-CAC-ACC-CGG-GAG-AAG-AA	GGT-GGT-CGC-TTC-GGG-TAA-AG
COL 1 A1	GCC-ATC-AAA-GTC-TTC-TGC-AAC-AT	ACC-AGA-CAT-GCC-TCT-TGT-CCT-T
ALP	CGT-GGC-TAA-GAA-TGT-CAT-CAT-GTT	TGG-AGC-TGA-CCC-TTG-AGG-AT
FAM20A	GTGCACAACTTTTCCCGAAC	GTGCCTCATGTCTTGCAGAA
BMP2	GAGGTTGCGGCTGCTCAGCATGTT	ACATGTCTCTTGGAGACACCT

RÉSULTATS

MORPHOLOGIE DES FGS DU PATIENT ATTEINT DE L'ERS

L'observation microscopique des boites de culture nous montre que les FGs du patient ERS conservent un aspect fusiforme (Figure 2).

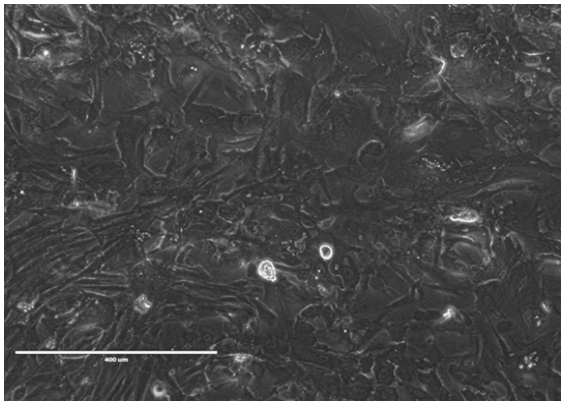

Figure 2 : Observation au microscope des FGs du patient malade en culture dans les boîtes de Pétri à confluence à J21 (grossissement 10x). Les cellules conservent un aspect fusiforme ou étoilé (Echelle barre 400 µm).

COLORATION DES CULTURES CELLULAIRES AU ROUGE ALIZARINE

De l'aspect macroscopique des puits de culture cellulaire après coloration au rouge Alizarine, il est noté une coloration plus marquée des FGs mutés par rapport aux FGs contrôles en milieu M (Figure 3).

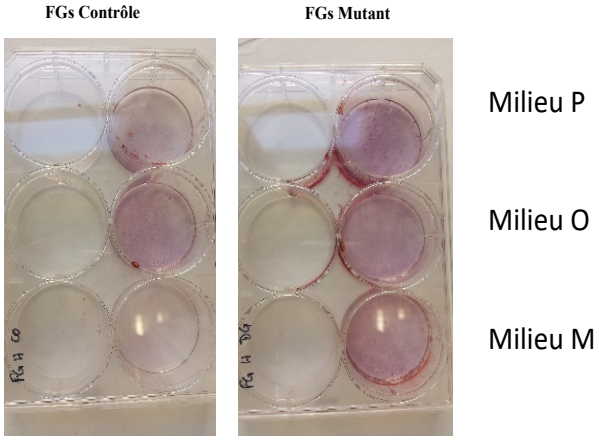

Figure 3: Image boites de culture cellulaire après coloration au rouge Alizarine à J28 des FGs de patient malade (droite) et du patient témoin (gauche).

 © EDUCI 2023

DIFFÉRENCIATION OSTÉOGÉNIQUE DES (FGS) DU PATIENT MALADE VS FGS CONTRÔLES

Après 28 jours de différenciation, la coloration au rouge alizarine des cultures cellulaires nous montre que les formations calciques les plus importantes ont lieu en présence de FGs mutés dans le milieu minéralisant (et non ostéo-différenciant) (Figure 4).

QUANTIFICATION DE L'EXPRESSION DES MARQUEURS DE DIFFÉRENCIATION OSSEUSE AU COURS DE LA MINÉRALISATION ECTOPIQUE GINGIVALE

Les principaux marqueurs ostéogéniques sont exprimés durant la différenciation des FGs mutés (M1), mais ces expressions restent relativement faibles particulièrement à J28 en milieu minéralisant, en comparaison avec les FGs contrôles (C1) (Figure 5).

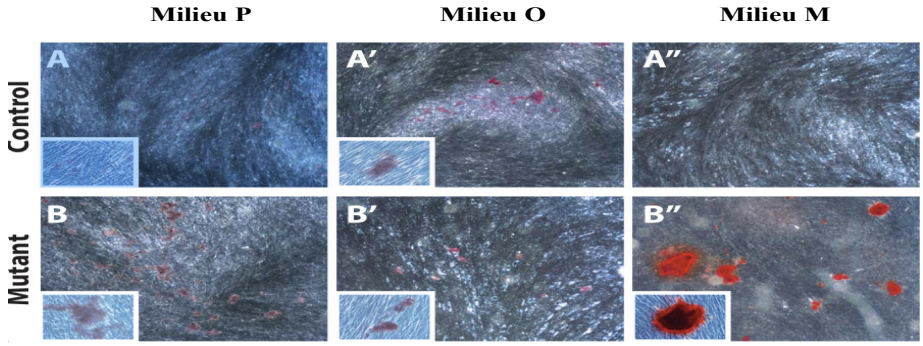

Figure 4 : Coloration rouge alizarine des cellules gingivales en culture observées par microscopie à contraste de phase montrant la présence de minéralisation

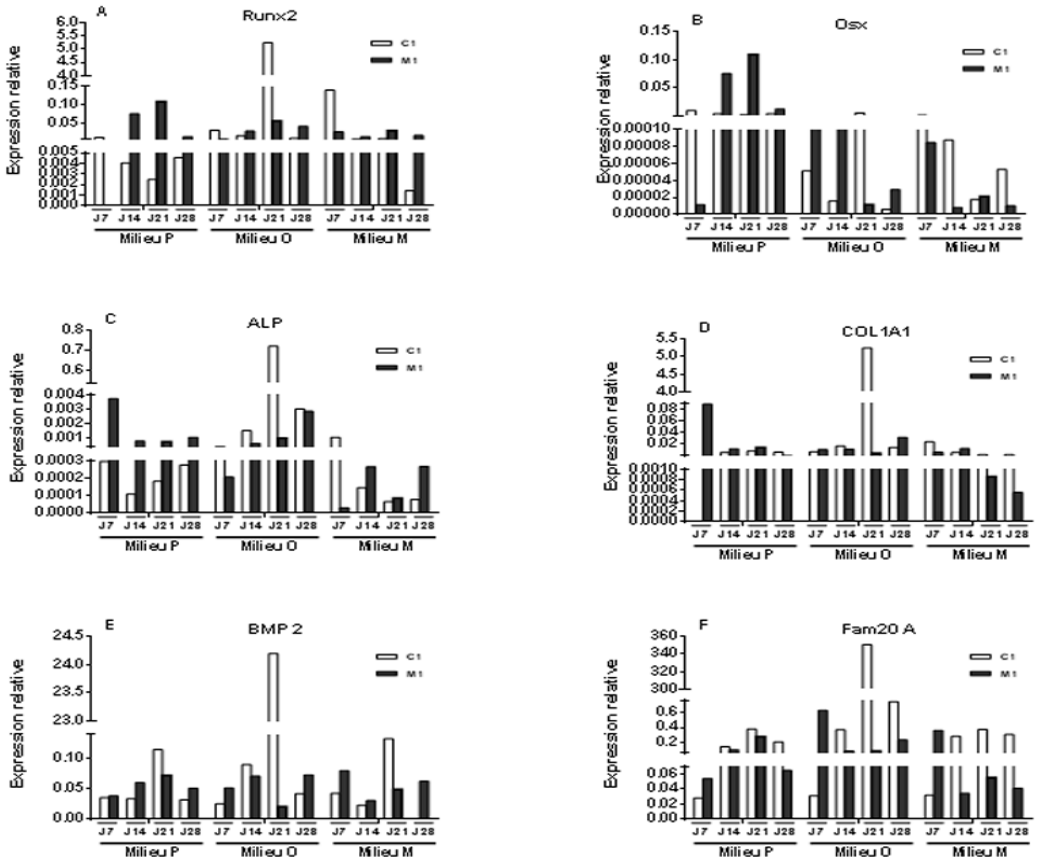

Figure 5: profil d'expression des différents gènes testés durant la différenciation des FGs mutés (M1) et contrôles (C1) en milieux de prolifération (P), ostéodifférenciant (O) et minéralisant (M) : runx2 (A), Osx (B), ALP (C), COL1A1 (D), BMP2 (E), FAM20A (F).

DISCUSSION

Les techniques de culture cellulaires peuvent être employées pour étudier l'expression des gènes et les tests de cytotoxicité [12]. Dans cette expérimentation, nous avons étudié le processus de minéralisation entrainant l'apparition de calcification gingivale ectopique dans le syndrome ERS. Nous avons également analysé le rôle central du FG potentiellement ostéodifférencié dans l'apparition des dites calcifications.

La méthode d'explant utilisée pour l'isolation et la production des FGs est une technique empirique, non chimique et peu onéreuse. Les cellules obtenues ainsi ont une meilleure capacité de migration contrairement aux autres techniques [13,14].

La morphologie des FGs obtenus ainsi avec cette méthode chez le patient malade semble identique à celle rencontrée habituellement. Mathew et al. en 2011, avait identifié sept sous-types morphologiques de fibroblastes allant de la forme fusiforme à la forme réticulaire [15]. Dans notre expérimentation, ces cellules se présentaient sous forme allongée, fusiforme ou réticulaire correspondant à un aspect normal des fibroblastes retrouvé dans la littérature [16]. Ces cellules ne semblent donc pas affectées par la mutation de FAM20 A sur le plan morphologique.

La coloration des cellules au rouge alizarine dans les trois milieux différents a révélé des calcifications à J28 en présence des FGs mutés dans le milieu minéralisant. Les FGs mutés n'étant pas orientés vers un profil ostéoblastique, les évènements à l'origine de calcifications ectopiques semblent se produire au niveau de la matrice extracellulaire (MEC). En effet, Ronchetti et al en 2013 stipulaient que la MEC des tissus conjonctifs pouvait être un élément déclencheur de minéralisation. Les changements qui interviennent dans les caractéristiques de la MEC et dans le rapport entre ses composants influencent non seulement les propriétés mécaniques des tissus conjonctifs, mais contribuent de manière significative à moduler le phénotype cellulaire par altération de l'expression de l'intégrine, des adhésions focales, de l'organisation du cytosquelette et par les voies de signalisation intracellulaire [17].

Par la suite, nous avons voulu évaluer l'expression des marqueurs osseux intervenant aux stades précoces, fonctionnels et tardifs de la différentiation osseuse. Runx 2, facteur de transcription multifonctionnel, stimule l'expression des gènes majeurs aux stades précoces d'ostéodifférenciation [18] ; Osx est également un facteur de transcription dont l'expression est dépendante de celle de Runx 2 ; il agit en aval de ce dernier dans les pré-ostéoblastes [19]. Dans notre travail, les FGs mutés en conditions ostéodifférenciante et minéralisante, expriment faiblement ces deux facteurs comparativement aux FGs contrôles. On pourrait en déduire que les cellules ne s'orientent pas vers un phénotype ostéoblastique.

L'ALP, une protéine enzymatique membranaire et COL1 A1 codant pour le collagène de type I, composant majoritaire de l'os, marquent l'activité des ostéoblastes fonctionnels. Normalement, plus les cellules osseuses progressent vers la phase de minéralisation, plus elles expriment ALP et COL1 A1 [20]. En milieu minéralisant, nous avons constaté une activité phosphatase alcaline et une expression collagénique faible en présence des FGs mutés à partir de J14 ; par conséquent ces cellules ne semblent pas se différencier en ostéoblastes sécréteurs.

Les BMP (BMP-2, 4, 6, 7), membres de la famille du TGF-β, sont produites par les ostéoblastes et jouent un rôle fondamental dans le contrôle de la formation osseuse. Les BMP agissent à plusieurs étapes, en augmentant l'expression de Runx 2 dans les précurseurs ostéoblastiques et en stimulant l'expression des gènes ostéoblastiques (ALP, COLI A1, ostéocalcine, etc...) dans les ostéoblastes [21]. La BMP-2 est impliquée dans les mécanismes de phosphorylation de la matrice osseuse. Il semblerait que BMP-2 possède la capacité de se lier à certains glycosaminoglycanes et d'induire ainsi la différenciation ostéoblastique lors des processus de minéralisation [22]. Cependant, nous avons constaté une expression relativement faible et stable de BMP-2 en présence des FGs mutés en milieu minéralisant et nulle en milieu ostéodifférenciant. Cette protéine ne semble donc pas intervenir dans la formation des calcifications observées dans nos puits de culture.

Enfin, les FGs mutés expriment FAM20A; si cette expression en condition ostéodifférenciante est très faible voire nulle, elle diminue à partir de J14 en milieu minéralisant. La mutation FAM20A engendrerait la formation d'une protéine tronquée ou l'absence complète de protéine inhibitrice de minéralisation ectopique dans la MEC.

 © EDUCI 2023

CONCLUSION

Ce travail a mis en évidence que la mutation de FAM20A engendre une modification des composants de la MEC qui pourrait aboutir à la formation de calcification ectopique. En effet, algré la mutation du gène, les FGs conservent leur phénotype et présentent une morphologie normale. Les résultats montrent par conséquent qu'ils n'ont pas d'influence dans le processus de calcification ectopique. D'autres investigations notamment au niveau protéique sont nécessaires pour valider ces résultats et déterminer le mécanisme d'action de FAM20A dans l'apparition des calcifications ectopiques dans la MEC des tissus conjonctifs.

RÉFÉRENCES

1. FARIAS MLM, ORNELA GO, DE ANDRADE RS, MARTELLI DRB, DIAS VO, JÚNIOR HM. Enamel Renal Syndrome: A Systematic Review. *Indian J Nephrol.* 2021;31(1):1-8.
2. DE LA DURE-MOLLA M, QUENTRIC M, YAMAGUTI PM, ACEVEDO AC, MIGHELL AJ, VIKKULA M, et al. Pathognomonic oral profile of Enamel Renal Syndrome (ERS) caused by recessive FAM20A mutations. *Orphanet J Rare Dis.* 2014;9:84.
3. MACGIBBON D. Generalized enamel hypoplasia and renal dysfunction. *Aust Dent J.* 1972;17(1):61-3.
4. MARTELLI-JÚNIOR H, DOS SANTOS NETO PE, DE AQUINO SN, DE OLIVEIRA SANTOS CC, BORGES SP, OLIVEIRA EA, et al. Amelogenesis imperfecta and nephrocalcinosis syndrome: a case report and review of the literature. *Nephron Physiol.* 2011;118(3):62-5.
5. ABREU FAM DE, REIS IDG, SILVA GAB, JORGE EC. Collection and Culture of Human Connective Tissue Cells from Gingival Explant Technique for Oral Tissue Bioengineering. *Int J Morphol.* 2019;37(4):1229-33.
6. BOOR P, FLOEGE J. The renal (myo-)fibroblast: a heterogeneous group of cells. *Nephrol Dial Transplant.* 2012;27(8):3027-36.
7. XU Q, JI Q, YANG J, XU X, YU X, WANG Z, et al. Comparison of the characteristics of human gingival fibroblasts isolated by tissue explants and by enzyme digestion methods. *Int J Clin Exp Med.* 2016;9(10):19757-63.
8. HÄKKINEN L, LARJAVA H, KOIVISTO L. Granulation tissue formation and remodeling: Granulation tissue formation and remodeling. *Endod Topics.* 2011;24(1):94-129.
9. SRIRAM G, BIGLIARDI PL, BIGLIARDI-QI M. Fibroblast heterogeneity and its implications for engineering organotypic skin models in vitro. *European Journal of Cell Biology.* 2015;94(11):483-512.
10. YAJIMA T, KUMEGAWA M, HIRAMATSU M. Ectopic Mineralization in Fibroblast Cultures. *Archivum histologicum japonicum.* 1984;47(1):43-55.
11. DIARRA A, DIALLO AM, GUIRASSY ML, OUÉDRAOGO RA, BATIONO R, MILLOGO M. Étude histologique des minéralisations ectopiques gingivales dans le syndrome émail rein. *Rev Col Odonto-Stomatol Afr Chir Maxillo-fac.* 2020;27(4):06-10.
12. BATIONO R, ROUAMBA A, DIARRA A, LYDIE BEUGRÉ-KOUASSI M, JORDANA F, BEUGRÉ JB. Culture of Human Gingival Fibroblasts: *An Experimental Model. CB.* 2020;8(1):8-11.
13. KLINGBEIL MFG, HERSON MR, CRISTO EB, DOS SANTOS PINTO D, YOSHITO D, MATHOR MB. Comparison of two cellular harvesting methods for primary human oral culture of keratinocytes. *Cell Tissue Bank.* 2009;10(3):197-204.
14. LAUER G, OTTEN JE, VON SPECHT BU, SCHILLI W. Cultured gingival epithelium. *Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery.* 1991;19(1):21-6.
15. MATHEW DG, SKARIAH KS, RANGANATHAN K. Proliferative and morphologic characterization of buccal mucosal fibroblasts in areca nut chewers: A cell culture study. *Indian Journal of Dental Research.* 2011;22(6):879.
16. HÄKKINEN L, LARJAVA H, FOURNIER BPJ. Distinct phenotype and therapeutic potential of gingival fibroblasts. *Cytotherapy.* 2014;16(9):1171-86.
17. RONCHETTI IP, BORALDI FP, ANNOVI GP, CIANCIULLI PM, QUAGLINO DP. Fibroblast involvement in soft connective tissue calcification. Front Genet [Internet]. 2013 [cité 26 déc 2020];4. Disponible sur: *https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fgene.2013.00022/full*
18. KOMORI T. Regulation of bone development and extracellular matrix protein genes by RUNX2. *Cell Tissue Res.* 2010;339(1):189-95.
19. NAKASHIMA K, ZHOU X, KUNKEL G, ZHANG Z, DENG JM, BEHRINGER RR, et al. The novel zinc finger-containing transcription factor Osterix is required for osteoblast differentiation and bone formation. *Cell.* 2002;108(1):17-29.
20. KARTSOGIANNIS V, NG KW. Cell lines and primary cell cultures in the study of bone cell biology. *Molecular and Cellular Endocrinology.* 2004;228(1-2):79-102.
21. MARIE P. Différenciation, fonction et contrôle de l'ostéoblaste. *Med Sci* (Paris). 2001;17(12):1252-9.
22. TAKADA T, KATAGIRI T, IFUKU M, MORIMURA N, KOBAYASHI M, HASEGAWA K, et al. Sulfated polysaccharides enhance the biological activities of bone morphogenetic proteins. *J Biol Chem.* 2003;278(44):43229-35.