

**UNIVERSITE LOUIS PASTEUR-STRASBOURG I**

**Faculté des Sciences de la Vie et de la Terre**

**THESE**

**Pour le grade de**

**DOCTEUR DE L'UNIVERSITE LOUIS PASTEUR**

*Sciences du vivant : aspects Moléculaires et Cellulaires de la Biologie*

Présentée et soutenue publiquement

Par

**Amal NADIRI**

**Molécules de signalisation au cours du développement dentaire chez  
la souris : BMP-2, -4, FGF-4 et WNT10b et leurs récepteurs**

JURY

Professeur Ariane BERDAL

Professeur Henry MAGLOIRE

Professeur Henri TENENBAUM

Docteur Hervé LESOT

Professeur Youssef HAÏKEL

Professeur Antony SMITH

Rapporteur externe

Rapporteur externe

Rapporteur interne

Directeur de Thèse

Co-directeur de Thèse

Examineur

*A mon papa*

*A mama*

*A mon frère*

# REMERCIEMENTS

*Monsieur le Docteur H. Lesot,*

Vos conseils et votre disponibilité m'ont permis de mener à bien cette thèse. Veuillez trouver ici l'expression de ma profonde reconnaissance pour l'aide et la confiance que vous m'avez témoigné tout au long de ce travail.

*Monsieur le Professeur Y. Haïkel,*

Votre confiance et votre soutien m'ont permis de mener à bien ces travaux et je vous remercie aussi de m'avoir fait goûter au plaisir de l'enseignement.

*Madame le Professeur A. Berdal,*

Je tiens à vous remercier chaleureusement pour l'honneur que vous me faites en acceptant de juger ce travail.

*Monsieur le Professeur H. Magloire,*

Je veuillez trouver ici ma profonde gratitude pour l'intérêt que vous portez à mon travail et mes plus vifs remerciements pour votre participation à ce jury.

*Monsieur le Professeur H. Tenenbaum,*

Je vous suis reconnaissante d'avoir consacré une partie de votre temps à la lecture de ce manuscrit et votre participation à ce jury.

*Professor AJ. Smith,*

You kindly accepted to participate in the review of my thesis. This is an honour for me and I wish to express my sincere thanks.

*Fabienne*

Je vous remercie de l'accueil chaleureux au sein de votre équipe et du temps que vous m'avez consacré à m'initier à l'hybridation *in situ*.

Je tiens également à remercier Corinne, Virginie qui contribuent à cette ambiance détendue.

Je remercie *Sabine* pour sa gentillesse, sa disponibilité et son soutien depuis les premiers jours de mon DEA jusqu'à la réalisation de ce manuscrit.

*Monsieur Cam*, grâce à vous on aime les bretons pas le choix, vous êtes une personnalité admirable

*Nadia*, merci pour ton soutien moral et ton optimisme

Bon courage pour les futurs doctorants *Bing, François, Alexandrine*

Merci *monsieur Fluck* pour votre bonne humeur débordante qui soulage dans beaucoup de moments.

Merci *monsieur Ackermann* pour votre assistance technique

Je remercie également l'ensemble des membres de l'unité *INSERMU595* et spécialement monsieur le *Docteur J-C Voegel*,

Un hommage aux moments inoubliables avec *Sabrina & Madame Roux*,

*Hicham*

Merci un très grand MERCI pour ton soutien quotidien, de ta confiance, de ta présence et ta grande patience durant ces derniers mois !

# TABLES DES MATIERES

<b>CHAPITRE 1 : INTRODUCTION .....</b>	<b>1</b>
<b>CHAPITRE 2: RAPPEL DES DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES</b>	
<b>I- La morphogenèse dentaire .....</b>	<b>3</b>
I.1. Lame dentaire.....	3
I.2. Bourgeon dentaire.....	3
I.3. Capuchon dentaire.....	3
I.4. Stade de la Cytodifférenciation .....	3
I.4.1. Les odontoblastes .....	4
I.4.2. Les améloblastes .....	4
<b>II- Les facteurs de croissance .....</b>	<b>5</b>
II.1. Les FGFs .....	5
II.2. Les BMPs .....	5
II.3. Shh .....	6
II.4. Les WNTs .....	7
<b>III- Aspects moléculaires au cours de la morphogenèse dentaire .....</b>	<b>8</b>
III.1. Stades initiaux .....	8
III.1.1. Détermination régionale de la dent .....	9
III.1.2. Détermination de l'identité des dents .....	9
III.2. Formation du bourgeon, une étape critique dans le développement dentaire .....	10
III.2.1. L'initiation des bourgeons dentaires.....	11
III.2.2. Elucidation de la signalisation établie dans le mésenchyme dentaire .....	11
III.2.3. Analyse du signal associé à la perte des dents pendant l'évolution.....	12
III.3. Régulation de la forme de la dent : rôles des nœuds de l'émail dans la morphogenèse coronaire.....	13
III.3.1. Le nœud de l'émail primaire (NEP) .....	14
III.3.2. Nœuds de l'émail secondaires .....	15

III.4. Cytodifférenciation des odontoblastes .....	16
III.5. Cytodifférenciation des améloblastes .....	17

---

## **CHAPITRE 3 : RÉSULTATS**

### **I. IMMUNOLOCALISATION DE BMP-2/-4, FGF-4 ET WNT10b AU COURS DU DÉVELOPPEMENT DENTAIRE**

I.1. Rappel des données & but du travail .....	18
I.2. Approches expérimentales .....	18
I.3. Résultats .....	20
I.4. Conclusions .....	20

### **II. EXPRESSION DES BMPRS AU COURS DU DÉVELOPPEMENT DENTAIRE**

II.1. Rappel des données .....	22
II.2. But du travail .....	22
II.3. Conditions expérimentales .....	23
II.4. Résultats et conclusions .....	23

### **III. L'HISTOGENESE EPITHELIALE *IN VITRO***

III.1. Rappel des données & but du travail .....	25
III.2. Approches expérimentales .....	27
III.3. Résultats .....	29
III.3.1. La formation du NEP .....	29
III.3.2. Expression de molécules de signalisation .....	29
a. WNTS et leur récepteur .....	29
b. $\beta$ -caténine et FGF-4 .....	29
III.4. Discussion .....	30

**IV. LE DOUBLE EFFET DE FGF-4 AU COURS DU DÉVELOPPEMENT  
DENTAIRE**

IV.1. Introduction .....34  
IV.2. Méthodes utilisées .....34  
IV.3. Résultats .....37  
IV.4. Discussion .....37

---

**CHAPITRE 4: DISCUSSION & PERSPECTIVES**

I- Histogenèse épithéliale .....39  
II- Apoptose au cours du développement dentaire .....44  
III- Le potentiel odontogène du mésenchyme .....46  
IV- Rôles de BMP-2 et-4 selon le stade considéré.....49  
**RÉFÉRENCES .....53**

## ABBREVIATIONS

- Am** : Améloblastes
- BMP** : Bone morphogenetic protein
- BrdU** : Bromodéoxyuridine
- EDE**: Epithélium dentaire externe
- EDI**: Epithélium dentaire interne
- EFA** : Enamel free area
- Ep-Mes** : interaction épithélio-mésenchymateuses
- FGF** : Fibroblast growth factor
- HSPG** : Protéoglycanes à héparane sulfate
- LC** : Lèvre cervicale
- MB** : membrane basale
- MEC** : Matrice extracellulaire
- NEP** : nœud de l'émail primaire
- NES** : nœuds de l'émail secondaires
- Od** : Odontoblastes
- RS** : réticulum stellaire
- Shh** : Sonic hedgehog
- SI** : stratum intermedium
- TGF- $\beta$**  : transforming growth factor- $\beta$
- WNT** : Wingless



## ***Figures et Tableaux***

- Figure 1** : Les différents stades du développement dentaire
- Figure 2** : Voie de signalisation des FGFs
- Figure 3** : Voie de signalisation des BMPs
- Figure 4** : Voie de signalisation des Wnts
- Figure 5** : Signaux impliqués dans la régulation des stades initiaux du développement dentaire
- Figure 6** : Etude de la prolifération des cellules épithéliales *in vitro*
- Figure 7** : Localisation des apoptoses en whole-mount
- Figure 8** : Coupes histologiques de réassociations entre mésenchyme dentaire et cellules épithéliales dissociées au stade de capuchon
- Figure 9** : Localisation de WNT5a, WNT10b et leur récepteur dans la molaire et dans des réassociations après 3j de culture
- Figure 10** : Localisation de la  $\beta$ -caténine et FGF-4 dans des réassociations après 3j de culture.
- Figure 11** : Expression des protéines FGF-4, FGF10 et leurs récepteurs
- Figure 12** : Détection des apoptoses en whole-mount sur la M<sub>1</sub> *in vitro*
- Figure 13** : Expression de Msx2 dans des mésenchymes dentaires en culture
- Tableau 1** : Expression des Fgfs au cours du développement dentaire
- Tableau 2** : Expression des Bmps au cours du développement dentaire
- Tableau 3** : Expression des Wnts au cours du développement dentaire
- Schéma 1** : Expression de Wnt10b, Wnt5a et Fz dans la molaire inférieure
- Schéma 2** : Action directe de WNT10 sur FGF-4 dans la M<sub>1</sub>
- Schéma 3** : Expression des gènes Bmp-2 et Bmp-4 et la localisation des protéines correspondantes dans la M<sub>1</sub>.
- Schéma 4** : Expression des protéines BMPR-IA,-B et -II dans la M<sub>1</sub>
- Schéma 5** : Expression des gènes Fgf-4 et Wnt10b et la localisation des protéines correspondantes dans la M<sub>1</sub>.

# ***Chapitre 1 : Introduction***

Généralement les mammifères possèdent une dentition hétérodonte, caractérisée par la coexistence de diverses morphologies coronaires adaptées à des fonctions différentes : des incisives, des canines, des prémolaires et des molaires. Chez la souris, notre modèle d'étude, chaque demi-mâchoire comporte une incisive à croissance continue et trois molaires à croissance limitée, séparées par un diastème dépourvu de dents. Contrairement à l'incisive, la molaire est une dent multicuspidée. La morphologie de la couronne se caractérise par un nombre défini de cuspides spécifique de chaque molaire. L'acquisition de la forme d'une dent est un processus multifactoriel complexe incluant en particulier des activités mitotiques différentielles, des phénomènes d'apoptoses et de migrations cellulaires (Ruch, 1995).

L'ébauche dentaire est constituée de deux composantes tissulaires, la pulpe dentaire d'origine ecto-mésenchymateuse et l'organe de l'émail d'origine épithéliale, séparés par une membrane basale continue. Les cellules ecto-mésenchymateuses issues de la crête neurale migrent jusqu'à la région présomptive des dents pour participer à la formation de la pulpe dentaire.

Le développement dentaire est contrôlé par des interactions épithélio-mésenchymateuses continues et réciproques et fait intervenir les quatre grandes familles de molécules de signalisation : BMP, FGF, Hh et Wnt. Depuis plusieurs années, de nombreuses études ont été menées sur l'expression des gènes codant pour ces molécules de signalisation au cours du développement dentaire. Les données d'hybridation *in situ* ont montré que ces gènes, principalement Bmp-2, -4, Fgf-4 et Wnt10b, sont exprimés au niveau du nœud de l'émail primaire (NEP) et plusieurs rôles leur ont été attribués en se basant sur leurs patrons d'expression, sur l'étude de souris knock-out et sur des tests fonctionnels.

Pour compléter ces données, notre travail peut se résumer à l'étude de quatre points complémentaires :

- 1) Dans un premier temps, nous avons étudié l'immunolocalisation de ces facteurs de croissance au cours du développement de la première molaire inférieure chez la souris.
- 2) Sachant qu'il s'agit pour la plupart de molécules diffusibles, nous avons cherché les cellules cibles de ces facteurs de croissance par l'étude de leurs récepteurs spécifiques.
- 3) Des réassociations entre mésenchymes dentaires au stade capuchon et différents types d'épithéliums donnent naissance à une dent *in vitro* (Kollar et Baird, 1970 ; Schmitt et coll., 1999 ;

Hu et coll., 2005). Ces expériences montrent et confirment le potentiel odontogène du mésenchyme au stade de capuchon dentaire. En se basant sur ces données, nous avons reconsidéré ce potentiel odontogène du mésenchyme sur l'histogenèse épithéliale et en particulier la mise en place d'un centre de signalisation fonctionnel.

4) Il a été suggéré que FGF-4 pourrait stimuler la prolifération cellulaire au niveau de l'épithélium dentaire et du mésenchyme (Kettunen et coll., 1999), alors qu'au cours du développement du bourgeon du membre, il a été montré que l'induction de l'apoptose par les BMPs nécessite la présence de FGF-4 (Montero et coll., 2001). Ces deux mécanismes pouvant coexister, nous avons cherché à savoir ce qu'il en était dans la dent.

## **Chapitre 2: RAPPEL DES DONNEE BIBLIOGRAPHIQUES**

### **I- La morphogenèse dentaire**

Le développement de la dentition nécessite initialement la mise en place de territoires spécifiques dans l'épithélium oral et le mésenchyme sous-jacent. La morphogenèse dentaire est classiquement divisée en quatre stades : stade de la lame, du bourgeon, du capuchon et de la cloche.

Au stade cloche, on observe successivement la différenciation terminale des odontoblastes (Od), sécrétant les constituants organiques de la prédentine-dentine et celle des améloblastes (Am), sécrétant les constituants de l'émail et le début de la formation des racines.

#### **I.1. *Lame dentaire***

La première manifestation morphologique du développement dentaire apparaît au 11<sup>ème</sup> jour du développement embryonnaire (E11) et consiste en un épaissement de l'épithélium buccal formant la lame dentaire (Fig. 1A). Le développement de la lame ne semble pas résulter d'activités mitotiques différentielles mais d'un changement d'orientation des fuseaux mitotiques des cellules épithéliales, les fuseaux mitotiques tendent à s'orienter perpendiculairement à la membrane basale (MB) (Ruch, 1984).

#### **I.2. *Bourgeon dentaire***

Au jour 13, la lame dentaire s'invagine fortement dans le mésenchyme sous-jacent pour former le bourgeon dentaire (Fig. 1B). Au même moment le mésenchyme se condense et va former la future papille dentaire et le mésenchyme périodentaire (Fig 1B).

#### **I.3. *Capuchon dentaire***

Au jour 14, le sommet du bourgeon commence à s'invaginer dans sa partie antérieure et se prolonge en direction postérieure. Cette étape est marquée par l'initiation de l'histomorphogenèse épithéliale avec la formation de l'épithélium dentaire interne (EDI) et externe (EDE) (Fig. 1C). L'EDI possède une activité mitotique plus importante que l'EDE (Osman et Ruch, 1976). Progressivement le réticulum stellaire (RS) et le stratum intermedium (SI) vont se différencier au sein de l'organe de l'émail (Fig. 1C).

#### **I.4. Stade de la cytodifférenciation**

La différenciation des odontoblastes et des améloblastes intervient dans chaque dent selon un patron spatio-temporel spécifique, elle débute au sommet des cuspides et progresse en direction apicale, formant un gradient de différenciation. La taille et la morphologie coronaire d'un type de dent varient en fonction du nombre d'odontoblastes et d'améloblastes post-mitotiques ainsi que de leur distribution spatiale.

##### **I.4.1 Les odontoblastes**

La différenciation des odontoblastes est contrôlée par l'EDI, et caractérisée par plusieurs étapes. Le phénomène de différenciation est initié dans chaque cuspide (Ruch, 1985) et s'effectue selon un schéma temporo-spatial spécifique (Lisi et coll., 2003). Chez la souris, les premiers odontoblastes différenciés apparaissent au jour 18 du développement embryonnaire, dans la première molaire inférieure au sommet de la cuspide principale. Le processus de différenciation de nouveaux odontoblastes s'étend ensuite progressivement en direction de la base des cuspides et conduit à la formation de gradients de différenciation (Ruch, 1995). Les cellules de la papille dentaire au contact de la MB sortent du cycle cellulaire ; lors de leur dernière division cellulaire, leur fuseau mitotique est orienté perpendiculairement à la jonction épithélio-mésenchymateuse (Ruch, 1987). Seules les cellules filles au contact de la MB vont se polariser. Ces cellules polarisées présentent des prolongements cytoplasmiques d'où sont sécrétés les principaux constituants de la prédentine/dentine.

##### **I.4.2. Les améloblastes**

La différenciation des améloblastes s'établit selon le même patron spatial que celle des odontoblastes. Une particularité caractérise les rongeurs : ce sont des zones sans émail ou EFA (Enamel Free Area), localisées au sommet des cuspides où la dentine n'est pas recouverte d'émail (Gaunt, 1956). La sortie du cycle cellulaire des premiers améloblastes intervient environ 24 hrs après l'apparition des premiers odontoblastes fonctionnels. La différenciation des améloblastes nécessite la présence de prédentine/dentine et s'accompagne de la dégradation de la MB. Les constituants de l'émail sont sécrétés au niveau des prolongements appelés " prolongements de tomes ".

## **II- Les facteurs de croissance et de signalisation**

## **II.1. Les FGFs**

Chez les vertébrés, la famille des FGFs (Fibroblast Growth factors) comporte au moins 24 membres et quatre récepteurs de haute affinité (FGFRs). Les FGFs possèdent une séquence (core) conservée d'environ 120 acides aminés qui leur confèrent la capacité de se lier à l'héparine ou aux protéoglycanes de type héparane sulfate (HSPG) (Ornitz, 2000) (Fig. 2). En interagissant avec l'héparine, les FGFs sont protégés de la protéolyse et de la dénaturation thermique (Moscatelli, 1987 ; Flaumenhaft et coll., 1990). En plus d'une liaison efficace des FGFs à leurs récepteurs de haute affinité, les HS permettent l'augmentation de la demie-vie du complexe FGF/FGFR (McKeehan et coll., 1998).

Les FGFRs sont des protéines transmembranaires à activité tyrosine kinase. La liaison d'un FGF à un monomère de récepteur induit la dimérisation du récepteur et stimule l'activité tyrosine kinase par un processus d'autophosphorylation qui déclenche la transduction du signal jusqu'aux gènes cibles (Ornitz, 2000). Plusieurs rôles ont été attribués aux différents FGFs au cours du développement des vertébrés et des invertébrés, dans la mesure où ils peuvent réguler la prolifération, la différenciation et la migration cellulaire (Szebenyi et Fallon, 1999). Ces effets peuvent être spécifiques d'un tissu du fait que la structure des HS peut varier d'un tissu à l'autre. Ces changements dans la structure des HS peuvent modifier l'activité des FGFs. Les HS interagissent avec les FGFs par différentes séquences, spécifique chacune d'un seul FGF (Faham et coll., 1999). Pour cette raison, il a été suggéré que la liaison de FGF-4 à l'un de ses récepteurs FGFR-1 ou FGFR-2 dépend de la concentration en héparine (Aviezer et coll., 1999).

Au cours du développement dentaire, les FGFs, en particulier FGF-8, ont un rôle majeur comme premiers signaux épithéliaux qui modulent l'initiation de la morphogenèse dentaire et surtout le développement au-delà du stade bourgeon dentaire (Neubuser et coll., 1997 ; Bei et Maas, 1998; Tucker et coll., 1998, 1999). Les FGFs sont des molécules de signalisation clés dans la régulation de la morphogenèse dentaire à différents stades du développement (Tableau 1).

## **II.2. Les BMPs**

Les BMPs (Bone Morphogenetic Proteins) font partie de la superfamille des TGF- $\beta$ s. Les BMPs sont des facteurs solubles, synthétisés et sécrétés sous forme de précurseurs inactifs. Ils sont activés par protéolyse, acquièrent une conformation spécifique et se dimérisent par des liaisons covalentes (ponts disulfures) (Revue de de Caestecker, 2004). Les dimères de BMPs se lient à deux types de récepteurs, I et II, pour former un complexe hétérotétramérique (Fig. 3). Comme les TGF-

$\beta$ s, les BMPs forment des homodimères mais aussi des hétérodimères. Cependant les hétérodimères sont plus actifs que la plupart des homodimères. Les BMPs ont une faible affinité pour chacun des deux types de récepteurs pris séparément. Seule la formation de complexes hétéromériques entre BMPR-I et BMPR-II permet aux BMPs une liaison efficace avec leurs récepteurs spécifiques (von Bubnoff et Cho, 2001). Cependant, selon le type de complexe ligand/récepteur, une multitude de fonctions différentes sera activée (Liu et coll., 1995).

Le complexe BMP-récepteur active par phosphorylation le complexe récepteur-Smad (R-Smads) 1, 5 ou 8 et ainsi initie une cascade de signalisation. Le complexe R-Smads s'associe à Smad4 (qui est aussi un composant de la voie des TGF- $\beta$ s) et permet ainsi sa translocation dans le noyau. La signalisation par les inhibiteurs (6 et 7) de Smads empêche la phosphorylation de R-Smads et/ou leur interaction avec Smad4. Les BMPs peuvent fonctionner comme des molécules morphogènes, qui stimulent des effets distincts au cours du développement d'une manière dose-dépendante. A l'extérieur de la cellule, la concentration d'une BMP lui permettant d'être active est régulée, en partie, par des inhibiteurs sécrétés tels que la noggin, la chordin, la follistatine, Tsg et Cerberus (Canalis et coll., 2003). Cependant, contrairement à celle de la noggin, l'expression de la follistatine est inhibée par les BMPs. Tsg est une molécule unique dans sa capacité à inhiber et/ou à stimuler l'activité des BMPs (Canalis et coll., 2003). Les Bmps -2, -3, -4, -5, -6 et -7 sont exprimés au cours du développement dentaire et jouent un rôle critique au cours de la morphogenèse (Tableau 2).

### ***II.3. Shh***

Les gènes Hedgehog (Hh) forment une famille de molécules de signalisation impliquées dans une variété de processus du développement chez les vertébrés (Hammerschmidt et coll., 1997). Chez la drosophile, le gène Hh définit les segments, l'aile, la patte et des régions du cerveau. Ceci se fait directement ou indirectement par le recrutement d'autres molécules de signalisation comme la Dpp et les Wingless (Wg). Au contraire de la drosophile qui ne possède qu'un seul gène Hh, les mammifères en ont trois copies : Sonic Hedgehog (Shh), Indian Hedgehog (Ihh) et Desert Hedgehog (Dhh), ce dernier étant probablement le plus ancien des gènes Hh chez les mammifères (Kumar et coll., 1996 ; Zardoya et coll., 1996). Shh est un élément essentiel pour le développement embryonnaire normal; les souris Shh  $-/-$  présentent un défaut de fonctionnement du tube neural, qui touche le système nerveux central. Ces souris présentent une inhibition importante de la prolifération cellulaire se manifestant par des anomalies craniofaciales sévères (Chiang et coll., 1996). SHH est une molécule

sécrétée sous forme de précurseur puis clivée en une partie N-terminale et une partie C-terminale. Seule la partie N-terminale de SHH est capable d'interagir avec un complexe transmembranaire formé de deux protéines : Patched (Ptc1) et smoothened (Smo) et permet ainsi la transduction du signal dans la cellule par l'intermédiaire du facteur de transcription Gli (Marigo et coll., 1996). Le mécanisme de cette interaction n'est pas encore bien élucidé (Ingham et McMahon, 2001 ; Nybakken et Perrimon, 2002). Shh est supposé jouer un rôle dans la prolifération cellulaire et dans la morphogenèse dentaire.

#### **II.4. Les WNTs**

Les Wnts constituent une famille de molécules de signalisation impliquées dans le contrôle du développement. Ce sont des glycoprotéines de poids moléculaires compris entre 39 et 45kDa, et riches en cystéine. L'être humain possède 19 gènes Wnt alors que la souris n'en possède que 18 (Miller, 2002). Les Wnts stimulent des activités cellulaires différentes: prolifération, migration et polarité cellulaire. Beaucoup de Wnts sont essentiels pendant l'embryogenèse, mais sont aussi actifs dans la régénération des tissus adultes tels que la peau, les follicules pileux et l'os (Alonso et Fuchs, 2003 ; Staal et Clevers, 2003).

Chez les vertébrés, les Wnts activent trois voies différentes, la voie Wnt/ $\beta$ -caténine, la voie Wnt/ $Ca^{2+}$  et le mécanisme du contrôle de la polarité cellulaire (Fig. 4) (Huelsen et Birchmeier, 2001; Fourgon et coll., 2003). La voie Wnt/ $\beta$ -caténine est communément connue sous le nom de la voie canonique (Fig. 4). Cette voie intervient dans le contrôle de la prolifération et de la survie cellulaire. La  $\beta$ -caténine est une molécule multifonctionnelle agissant en particulier au cours de la signalisation par Wnt et de l'adhésion cellule-cellule (Willert et Nusse, 1998 ; Hecht et Kemler, 2000 ; Obara et Lesot, 2004). Cette protéine est essentiellement impliquée dans les jonctions adhérentes : les protéines libres non impliquées dans ces jonctions sont phosphorylées par la GSK (glycogen synthase kinase) et rapidement dégradées par les protéosomes. En présence du signal Wnt, cette phosphorylation par la GSK est inhibée, ce qui permet à la  $\beta$ -caténine de s'accumuler dans le noyau, de s'associer au complexe de transcription LEF/TCF et d'activer la transcription de gènes cibles. La voie Wnt/ $Ca^{2+}$  augmente le niveau du calcium intracellulaire (Wang et Malbon, 2003) alors que la voie Wnt/polarité cellulaire active plusieurs protéines modulant l'organisation du cytosquelette (Habas et coll., 2003).

Les WNTs se lient à des récepteurs membranaires au nombre de 10 chez l'homme et 9 chez la souris, connues sous le nom de Frizzled (Fzds) (Bhanot et coll., 1996). Peu de données existent sur la



spécificité ou l'affinité WNT/ligand, mais il doit exister des redondances puisqu'il y a deux fois autant de Wnts que de Fzds.

Les gènes Wnt sont exprimés au cours du développement dentaire de la souris, avec des distributions spatio-temporelles spécifiques (Tableau 3) (Dassule et McMahon, 1998 ; Sarkar et Sharpe, 1999). Plusieurs membres de la famille des Wnts participeraient aux interactions épithélio-mésenchymateuses pendant l'odontogenèse. Dickkopf1 (Dkk1), un inhibiteur diffusible de la voie de signalisation de Wnt canonique, peut provoquer un arrêt du développement au stade bourgeon au niveau de la molaire et de l'incisive (Andl et coll., 2002). Une des cibles directes de LEF-1 dans les germes dentaires est le gène Fgf-4. FGF-4 est capable de restaurer l'arrêt du développement de la dent chez les souris Lef-1 -/- (Kratochwil et coll., 2002).

### **III. Aspects moléculaires au cours de la morphogenèse dentaire**

Le développement dentaire chez les mammifères peut être divisé en une séquence d'événements débutant dans son ensemble par la détermination régionale de la dentition, elle se poursuit par celle des territoires spécifiques à chaque type de dent et se termine par l'établissement des morphologies de dents individuelles dans chaque famille de dents. Toutes ces étapes de la morphogenèse dentaire sont régulées à des degrés divers par des molécules de signalisation et des facteurs de croissance appartenant aux quatre familles majeures FGFs, BMPs, Hh et WNTs (Fig. 5).

#### **III.1. Stades initiaux**

Les premières étapes du développement dentaire ressemblent morphologiquement à celles du développement d'autres tissus épithéliaux, tels que les cheveux et/ou les glandes mammaires. Dans tous ces organes, le développement est régulé par des interactions entre l'épithélium et le mésenchyme sous-jacent. Ces interactions font intervenir la matrice extracellulaire (MEC) (dont la MB) qui peut agir en tant que substrat spécifique ou en tant que réservoir de facteurs paracrines ou autocrines. Son importance dans le développement a été étudié par dissociation et réassociation de la pulpe et de l'organe de l'émail aux mêmes stades (recombinaisons isochrones) et à des stades différents (recombinaisons hétérochrones) (Karcher-Djuricic et coll., 1979 ; Osman et Ruch, 1981).

### III.1.1. Détermination régionale de la dent

La spécification régionale de chaque type de dent fait intervenir plusieurs mécanismes moléculaires. Initialement, FGF8 est essentiellement impliqué dans la spécification régionale du côté oral du premier arc branchial (Tucker et coll., 1999). Plus tard, FGF et BMP déterminent l'emplacement de l'expression mésenchymateuse de Pax9, un facteur de transcription important pour la morphogenèse dentaire (Peters et coll., 1998). A E10, FGF8 stimule l'expression de Pax9 au niveau du mésenchyme alors que BMP2 et BMP4 l'inhibent. Il a été suggéré que cette signalisation antagoniste déterminerait les emplacements des futurs bourgeons dentaires (Neubuser et coll., 1997). Cependant, chez les souris knock-out pour Pax9, les bourgeons se développent dans leurs emplacements normaux. Pax9 n'est donc pas le seul gène impliqué dans cette fonction. En effet, l'expression de gènes tels que Pitx2 et Shh est restreinte au stade de la lame dentaire, et devient alors plus spécifique à la formation du bourgeon dentaire, par conséquent plus importante dans la formation des futurs bourgeons (Keränen et coll., 1999).

### III.1.2. Détermination de l'identité des dents

Le mésenchyme dentaire dérive de la crête neurale dans la région du mésencéphale (Imai et coll, 1996 ; Köntges et Lumsden, 1996). L'origine des cellules de la crête neurale (Ruch, 1995 ; Sharpe, 1995) pourrait intervenir dans la détermination du type de dent. Cependant, des expériences de recombinaisons tissulaires semblent privilégier l'importance de l'épithélium dentaire, plutôt que l'origine des cellules de la crête neurale (Mina et Kollar, 1987 ; Lumsden, 1988). Les molécules de signalisation participant à ce phénomène sont les mêmes que celles impliquées dans la détermination des territoires odontogènes. Pour démontrer la participation de BMPs, des expériences ont été réalisées en exposant le premier arc mandibulaire (E9-10) à la noggin, un inhibiteur des BMPs. Cela conduit à la transformation des incisives en molaires (Tucker et coll., 1998). Bmp-4, qui est exprimé dans la partie antérieure de l'arc mandibulaire, est capable d'inhiber l'expression du gène de l'homéoboîte Barx1. L'expression de ce gène est limitée au mésenchyme dentaire pendant l'initiation de la morphogenèse et cette expression est stimulée par FGF8 présent dans l'épithélium de la lame dentaire. Aux stades précoces, les cellules de la crête neurale de plusieurs régions sont sensibles aux effets de BMP4 et FGF8, il en a été conclu que le devenir de ces cellules est déterminé par le signal de BMP et FGF épithéliaux. Une action dynamique de molécules de signalisation intervient dans le contrôle des premiers processus du développement dentaire, cela par une activation différentielle de facteurs de transcription. Ces observations ont permis de proposer l'existence d'un code combinatoire

de gènes à homéoboîte pour expliquer la détermination de l'identité dentaire (Tucker et Sharpe, 1999).

De nombreux facteurs de transcription, en plus de Barx1 et Pax9 ont été identifiés dans le mésenchyme comme cibles des premiers signaux d'origine épithéliale. Les FGFs peuvent induire l'expression des gènes de l'homéoboîte Lhx6 et 7, Msx1, Dlx1 et 2, alors que les BMPs régulent celles de Msx1, 2, et Dlx2 et que Shh induit Gli1, 2 et 3 (Vainio et coll., 1993 ; Tucker et coll., 1999). Plusieurs de ces gènes exécutent des fonctions essentielles au cours des stades initiaux du développement dentaire. Cela a été mis en évidence par l'étude des souris transgéniques, montrant un arrêt du développement de la dent au stade de la lame ou du bourgeon dentaire. Ainsi les doubles mutants (Msx1 et 2) et (Gli2 et 3) présentent un arrêt du développement des incisives supérieures au stade du bourgeon et, chez le double mutant (Dlx1 et 2), seules les molaires maxillaires sont affectées. L'analyse détaillée de chaque mutant montre que les fonctions régulatrices des gènes impliqués dans ces symptômes sont restreintes à quelques organes uniquement, alors que ces gènes sont, pour la plupart, exprimés très intensément dans d'autres organes.

De telles observations supposent que, soit ces gènes et ces protéines sont inutiles, soit ils sont exprimés en surplus. Mais le fait que les phénotypes dentaires sont seulement évidents chez les doubles mutants, indiquerait l'existence de redondances au niveau de certains organes pour pallier à la déficience de certains gènes, ce qui rend encore plus complexe la compréhension des événements moléculaires impliqués dans le développement dentaire. La restriction du phénotype dentaire aux molaires supérieures dans le double mutant (Dlx1 et 2) indique des différences spécifiques à chaque mâchoire dans la régulation de l'expression des gènes Dlx. Dlx1 et 2 sont tous deux exprimés dans les molaires supérieures et inférieures, alors que Dlx5 et 6 sont seulement présents dans les régions des molaires inférieures (Thomas et coll., 1997) : les gènes Dlx5 et 6 compenseraient la perte de Dlx1 et 2 dans les molaires inférieures. Les différences dans l'expression des Dlx entre molaires supérieures et inférieures peuvent être reliées à la détermination régionale des molaires au sein de leurs mâchoires respectives (Tucker et Sharpe, 1999).

### **III.2. Formation du bourgeon, une étape critique dans le développement dentaire**

Après les stades d'initiation de la morphogenèse dentaire intervient la formation d'un bourgeon. Cette étape marque le passage du potentiel d'induction au sein des tissus dentaires, l'épithélium dentaire présomptif gouverne le développement dentaire lors de la phase d'initiation (Mina et Kollar,

1987 ; Lumsden, 1988) puis ce potentiel d'induction est transféré dans le mésenchyme lors du développement du bourgeon dentaire (Kollar et Baird, 1969, 1970).

### III.2.1. L'initiation des bourgeons dentaires

Deux molécules de signalisation ont été identifiées dans le mésenchyme au début de la formation du bourgeon dentaire, BMP4 dont l'expression est induite par BMP4 épithéliale par le biais de Msx1 (Vainio et coll., 1993 ; Bei et Maas, 1998), et l'activine- $\beta$ A qui est induite par FGF8 présent dans les cellules épithéliales (Ferguson et coll., 1998). Chez les souris knock-out pour l'activine- $\beta$ A, toutes les dents, à l'exception des molaires supérieures, montrent un arrêt du développement au stade bourgeon. Quand la formation du bourgeon dentaire est bien visible, on remarque l'expression intense de plusieurs facteurs de transcription (p21, Msx2 et Lef1) dans un sous-ensemble de cellules au sommet du bourgeon. Bien que cette région soit considérée comme le précurseur d'un centre de signalisation transitoire, peu d'études ont porté sur la nature de ce centre de signalisation précoce et plus précisément sur les mécanismes de sa formation. Les interactions latérales dans l'épithélium dentaire peuvent être aussi impliquées dans la délimitation de domaines d'expression des gènes marqueurs de ce centre (Dassule et McMahon, 1998), mais il est possible que les signaux clés du mésenchyme tels que BMP4 et l'activine- $\beta$ A soient impliqués dans l'initiation de la formation du bourgeon et par la suite dans la formation de ce centre de signalisation. Le rôle clé de l'activine- $\beta$ A, au cours de ce stade a été démontré par le fait que l'apport exogène en cette protéine permet de restaurer le phénotype chez la souris knock-out ; ceci n'ayant lieu que dans la phase initiale du développement du bourgeon dentaire (Ferguson et coll., 1998).

### III.2.2. Elucidation de la signalisation établie dans le mésenchyme dentaire

Il a été montré que la signalisation opérée par chacune des quatre familles, BMP, FGF, Shh et Wnt, conduit à des effets moléculaires distincts sur le mésenchyme. Les molécules de signalisation d'une famille donnée ont leurs propres récepteurs à la surface cellulaire et les cascades intracellulaires sont en grande partie différentes d'une famille à l'autre. Cependant, au cours du développement dentaire, les membres des différentes familles peuvent activer en partie les mêmes cibles au niveau transcriptionnel. Par exemple, FGF et BMP activent à la fois Msx1 et Dlx2, alors que Msx2 est activé seulement par BMP et Dlx1 par FGF (Bei et Maas, 1998 ; Kettunen et Thesleff, 1998). Wnt et BMP peuvent induire tous les deux l'expression de Lef1 dans le mésenchyme. Msx1 paraît être aussi un composant de la voie Shh, car l'expression du récepteur de Shh, Ptc, qui est

régulée par Shh dépend de l'expression de Msx1 dans le mésenchyme dentaire (Zhang et coll., 1999). De façon plus intéressante, bien que Shh règle l'expression du gène Gli dans le mésenchyme, il ne stimule pas l'expression de Msx1 ou Lef1 (Dassule et McMahon, 1998 ; Hardcastle et coll., 1999), alors qu'il paraît réprimer l'expression de Wnt10b dans l'épithélium (Dassule et McMahon, 1998). En outre, Shh ne stimule pas l'expression de Bmp dans le mésenchyme dentaire contrairement à ce qui se passe dans le membre et il ne stimule ni Fgf3 ni Fgf10 (Kettunen et coll., 2000).

La signalisation des différents gènes cités est propre à chaque stade. L'analyse de l'expression des gènes et des réponses au signal chez les différentes souris knock-out a permis d'élucider les voies de signalisation spécifiques et de montrer que les réponses du mésenchyme sont différentes selon qu'il s'agit d'un stade initial du développement dentaire (la lame dentaire) ou à compter de E12 (début du stade bourgeon dentaire). Par exemple, Msx1, Bmp-4 et Lef1 sont absents dans le bourgeon à E13 chez les souris Pax9<sup>-/-</sup>. Donc, Pax9 paraît être en amont de ces gènes à E13. Par contre, l'expression de Msx1 est normale chez les souris Pax9<sup>-/-</sup> avant E12. De la même façon, l'expression de Dlx1 est affectée après E12 dans les mutants Msx1, alors qu'elle ne l'est pas au stade de la lame dentaire où l'expression de Dlx1 est normale (Bei et Maas, 1998). Toutes ces observations montrent à la fois le rôle des différents gènes dans les changements du mésenchyme avec l'avancement du développement, la nature séquentielle des interactions réciproques entre l'épithélium et le mésenchyme et la façon dont la progression de l'histogenèse a lieu.

### III.2.3. Analyse du signal associé à la perte des dents pendant l'évolution

Beaucoup de lignées de mammifères ont perdu quelques-unes de leurs dents au cours de leur évolution. Les rongeurs manquent de canines et de prémolaires, faisant de la souris en particulier un modèle très spécifique d'étude dentaire. Les bases moléculaires de cette perte de dents au cours de l'évolution chez les rongeurs ont été étudiées principalement dans la mâchoire supérieure chez les souris et les campagnols (Tureschova et coll., 1995 ; Witter et coll., 2005). Dans leur diastème maxillaire, des rudiments dentaires apparaissent de façon transitoire. Ils se développent jusqu'au stade bourgeon. Cette involution des bourgeons de dents rudimentaires seulement présents pendant les stades embryonnaires peut être associée à quelques aspects de la signalisation qui paraissent être actifs. Particulièrement Shh et Lef1, sont exprimés dans les bourgeons au niveau du diastème du campagnol jusqu'à leur disparition par apoptose alors que l'expression de Pax9 est plus faible au niveau du diastème à une étape plus précoce du développement. Donc, l'arrêt du développement dentaire au stade du bourgeon est apparemment une étape clé dans le diastème des rongeurs

impliquant des gènes qui participent déjà à la formation de la lame dentaire. En ce qui concerne la dent, ce délai entre la cause de l'arrêt du développement et la cessation réelle de la morphogenèse a été vérifié dans quelques souris mutantes, telles que *Lef1*<sup>-/-</sup> (Kratochwil et coll., 1996) et *activine-βA*<sup>-/-</sup> (Ferguson et coll., 1998).

Les oiseaux représentent un cas extrême de perte des dents. Bien que les oiseaux n'aient plus de dents, leurs ancêtres en ont eu, d'où la spéculation sur la possibilité qu'auraient les oiseaux d'avoir encore la compétence pour la formation de dents. Il a été montré que l'épithélium odontogène d'embryons de souris pris au 11<sup>ème</sup> jour (E11) induit des changements morphologiques et moléculaires semblables dans le mésenchyme dérivant de la crête neurale d'embryon de poulet et celui de l'arc branchial d'embryon de souris, y compris l'expression de *Msx* (Wang et coll., 1998). Cela indique que les cellules de la crête neurale d'embryon de poulet restent compétentes à initier un développement dentaire en réponse à une signalisation d'origine épithéliale odontogène. Les gènes impliqués dans le développement de la dent précoce peuvent être activés dans des tissus aviaires. En particulier, l'expression différentielle de *Bmp-4* et de *Fgf8* dans le tissu épithélial à E11 permet l'expression complémentaire de *Msx1* et de *Barx1* dans l'arc mandibulaire aviaire comme dans son homologue murin (Tucker et coll., 1998 ; Barlow et coll., 1999).

### **III.3. Régulation de la forme de la dent : rôles des nœuds de l'émail dans la morphogenèse coronaire**

La dynamique de la transition du stade bourgeon au stade du capuchon a été analysée en détails sur les molaires de souris. La transition bourgeon-capuchon est une étape critique dans la morphogenèse dentaire. Cette étape est caractérisée par la mise en place au niveau de la dépression épithéliale d'une structure transitoire, le nœud de l'émail primaire (NEP), un centre qui exprime les mêmes molécules de signalisation que le premier centre épithélial précoce (Vaahtokari et coll., 1996). Cette structure exprime dix molécules de signalisation appartenant aux BMPs, FGFs, Hh et à la famille des Wnts. Pour cette raison, il a été suggéré que le NEP contrôlerait la morphogenèse dentaire, et sa mise en place semble être un pré-requis pour la suite du développement dentaire. En effet, le développement de la dent s'arrête à l'étape du bourgeon chez les souris knock-out *Lef1*, *Msx1* et *Pax9* (Kratochwil et coll., 1996 ; Bei et Maas, 1998) : aussi la formation du capuchon dentaire paraît-elle dépendre encore du même type de signaux qu'au stade du bourgeon dentaire.

Aucun NEP ne se développe dans les bourgeons arrêtés chez les embryons de souris mutantes et, de façon intéressante, un trait commun aux trois mutants est l'absence de l'expression du gène *Bmp-4* dans le mésenchyme dentaire. *BMP4* est par conséquent un bon candidat qualifiant le mésenchyme dans son rôle d'inducteur de la transition bourgeon-capuchon. Le rôle de *BMP4* dans la mise en place du noeud de l'émail a été confirmé *in vitro* par la mise en culture d'épithéliums dentaires isolés au contact de billes contenant la protéine *BMP4*. Le résultat montre une induction de l'expression de certains marqueurs de ce centre de signalisation tels que *p21* et *Msx2* (Jernvall et coll., 1998). Par ailleurs, il a été montré que le mésenchyme n'intervenait pas uniquement dans la mise en place du NEP mais aussi dans son devenir (Schmitt et coll., 1999).

### *III.3.1. Le nœud de l'émail primaire (NEP)*

Au cours de la morphogenèse dentaire, le NEP pourrait intervenir dans la cuspidogénèse. Le NE de l'incisive diffère de celui de la molaire car il présente un arrangement histologique beaucoup moins marqué, très peu d'apoptoses et une durée de vie plus courte (Kieffer et coll., 2000). Les expériences d'hybridation *in situ* ont montré que *Fgf4* et *Shh* étaient spécifiquement exprimés au niveau de cette structure dont le rôle relatif, au cours de la morphogenèse dentaire vient d'être discuté. D'autres molécules de signalisation ont été détectées comme *Bmp-2*, *-4*, *-7*, *Msx2* et *Fgf9* (Kettunen et Thesleff, 1998). Le rôle central joué par le NEP dans la cuspidogénèse, est illustré par les conséquences de certaines mutations conduisant à l'interruption de l'expression de certains gènes exprimés dans cette structure ou impliqués dans sa mise en place. Le modèle de souris *Tabby* a montré que les cuspides des molaires étaient très perturbées dans leur taille, leur position et leur nombre (Peterkova et coll., 2000). La présence d'un NEP réduit en taille, exprimant tous les facteurs de signalisation connus classiques mais peut être en plus faible quantité, pourrait expliquer l'observation d'un tel phénotype (Pispa et coll., 1999). Chez la plupart des souris mutantes (*Lef1*, *Msx*, *Pax9*) en plus de l'absence de *Bmp-4* au niveau du mésenchyme, l'interruption de l'expression du facteur de transcription *Cbfa-1* dans le mésenchyme (exprimé normalement au cours de la transition bourgeon-capuchon), provoque l'arrêt du développement dentaire au stade capuchon (D'Souza et coll., 1999).

Dans la molaire, le NEP disparaît par apoptose quelques heures après sa formation. Il a été suggéré que la mort programmée des cellules du NEP pourrait réguler la durée des signaux exprimés par cette structure et ainsi influencer la morphologie des cuspides. La progression normale du cycle cellulaire est régulée en partie par une famille de protéines, les inhibiteurs de kinases cyclines-

dépendantes (Cdk). Ces facteurs inactivent indirectement une protéine nommée la rétinoblastome (Rb), en inhibant sa phosphorylation. Une de ces protéines, le facteur p21, est sur-exprimée par les cellules du NEP. Cependant, les souris déficientes en p21 ne présentent pas de défauts dentaires, indiquant que son rôle n'est toutefois pas essentiel dans le développement dentaire. De plus, l'absence de ce dernier est aisément compensée par l'expression d'autres inhibiteurs de kinases cyclines-dépendantes dont les caspases, un groupe de protéases activées par clivages protéolytiques au cours de la mort cellulaire programmée. Il est probable que les caspases soient activées lors de la mort cellulaire programmée des cellules épithéliales du NEP. L'inhibition de ces caspases au stade capuchon dentaire n'a aucune influence sur le développement dentaire avec l'apparition d'une structure au niveau de l'organe de l'émail qui n'interfère pas avec le déroulement de la morphogénèse épithéliale (Coin et coll., 1999). Le facteur de transcription Msx-2 intervient probablement au cours de l'apoptose au niveau du NEP sachant que les doubles mutants Msx1/Msx2 présentent une inhibition de ce mécanisme dans le bourgeon de membre (Maas et Bei, 1997). Fgf-4, Bmp-2, Bmp-4 et Wnt10b sont exprimés dans les cellules du NEP. Il a été montré que les protéines FGF4, EGF et WNT, appliquées localement, préviennent chacune l'apoptose des cellules épithéliales, tandis que BMP-2/-4 induisent cette apoptose.

### *III.3.2. Noeuds de l'émail secondaires (NES)*

Dans les molaires, la disparition du NEP fait place à de nouveaux NE secondaires (NES) localisés aux sommets des cuspidés. La formation de ces structures pourrait être induite par le NEP par l'intermédiaire de signaux diffusant à travers l'EDI. Mais des expériences ayant trait à la cinétique cellulaire ont révélé que l'EDI est constitué de cellules dans le cycle et d'une minorité de cellules hors cycle ; cet ensemble de cellules hors cycle est dispersé au cours de la cuspidogénèse, en autant de sous-ensembles que de cuspidés qui se forment (Coin et coll., 1999). Etant donnée l'expression spécifique de Fgf4 et celle plus diffuse de Shh et de Msx2, il a été proposé pour ces NES un rôle dans la régulation de la croissance des cuspidés. L'expression de Bmp-4 dans le mésenchyme et de Shh dans l'épithélium pourrait inhiber la diffusion de FGF4 dans le reste de l'EDI et ainsi réguler la position précise et les écarts entre les différentes cuspidés. Comme le NEP, les cellules des NES sont non-prolifératives. L'apoptose des cellules des NES est aussi associée à l'expression de Bmp-4, mais ce phénomène de mort cellulaire programmée est moins important dans les NES que dans le NEP. Alors que Fgf4 et p21 paraissent intervenir dans l'initiation du développement des cuspidés, seule l'expression de Fgf4 est restreinte aux cellules des NES.



### **III.4. Cytodifférenciation des odontoblastes**

Les cellules de la lignée odontoblastique passent par plusieurs états de différenciation. Successivement les cellules se différencient en odontoblastes polarisés, en odontoblastes sécréteurs puis en odontoblastes matures. La différenciation entraîne aussi bien des changements cytologiques que des changements transcriptionnels et traductionnels. Dès l'étape de polarisation, les odontoblastes commencent à synthétiser les constituants de la prédentine/dentine comprenant des collagènes, des glycoprotéines, des sialoprotéines, des phosphoprotéines, des protéoglycanes (PGs), des glycosaminoglycanes et des facteurs de croissance. De nombreuses protéines exprimées par les odontoblastes le sont aussi par différentes cellules de l'organisme en particulier les ostéoblastes. Actuellement, seules deux protéines sont connues pour être plus spécifiquement exprimées et sécrétées par les odontoblastes : la phosphoprotéine dentinaire (DPP) et la sialoprotéine dentinaire (DSP). Ces deux protéines sont codées par un gène unique. Le transcrit de ce gène donne naissance à une protéine précurseur : la sialophosphoprotéine dentinaire (DSPP), qui va être clivée par la suite. D'autres phénomènes peuvent être associés à la différenciation terminale des odontoblastes. En effet, des modifications de la membrane cellulaire, comme l'augmentation de l'activité de l'adénylate cyclase (Osman et Ruch, 1981) et l'accumulation/redistribution apicale des récepteurs de la concanavalline A et de la fibronectine ont été observées (Meyer et coll., 1981; Lesot et coll., 1988). L'évolution de la composition de la MB accompagne donc la différenciation des odontoblastes. Les constituants principaux de la MB sont les collagènes IV et III, la fibronectine, la laminine (Lesot et coll., 1981 ; Thesleff et coll., 1981), le nidogène (Kubler et coll., 1988), la ténascine (Chiquet-Ehrismann, 1990 ; Erickson et Bourdon, 1989), l'acide hyaluronique et des protéoglycanes à héparane sulfate (Thesleff et coll., 1981). La polarisation des odontoblastes s'accompagne de la disparition progressive du collagène de type III (Lesot et coll., 1981) à la jonction épithélio-mésenchymateuse. La fibronectine qui entoure les préodontoblastes va s'accumuler au pôle apical des odontoblastes polarisés (Lesot et coll., 1981 ; Meyer et coll., 1989), le collagène de type I, la décorine et le biglycane présents dans la matrice extracellulaire (MEC), s'accumulent également au pôle sécréteur des cellules polarisées (Lesot et coll., 1994). Les molécules de la MEC interviennent également dans le processus de différenciation odontoblastique, par l'intermédiaire de récepteurs membranaires. Une protéine a été largement étudiée à ce sujet : la fibronectine (Lesot et coll., 1985).

Concernant les facteurs de croissance et leur(s) récepteur (s), de nombreuses expériences d'immunolocalisation et d'hybridation *in situ*, suggèrent l'intervention de certaines protéines dans la différenciation terminale des odontoblastes tel que l'hormone de croissance ou Growth Hormone (GH) (Zhang et coll., 1997). L'immunohistochimie de IGF-I (de la famille des IGF : Insulin Growth Factor) et de son récepteur a montré que ces molécules étaient synthétisées localement par les cellules de la dent en formation. D'autre part, une forte immunoréactivité a été observée pour IGF-I au niveau des odontoblastes en cours de différenciation. Ces résultats semblent indiquer que IGF-I pourrait y jouer également un rôle paracrine et/ou autocrine (Joseph et coll., 1993 ; 1996). Dans la superfamille des TGF $\beta$ -1, -2, -3 (Cam et coll., 1990 ; D'Souza et coll., 1990 ; TheSLeff et Vaahtokari, 1992) et les BMP-2, -4, -6 (Lyons et coll., 1990 ; Vainio et coll., 1993 ; Begue-Kirn et coll., 1994) jouent également un rôle dans la polarisation et la différenciation. L'analyse du schéma d'expression de ces facteurs de croissance a permis de mettre en évidence leurs transcrits dans les cellules del'EDI, en face des cellules odontoblastiques.

### **III.5. Cytodifférenciation des améloblastes**

Les améloblastes se disposent en palissade au niveau de l'EDI. Ils acquièrent rapidement un prolongement cytoplasmique face à la lame basale qui les sépare du compartiment odontoblastique. Les améloblastes subissent plusieurs phases de différenciation (Fincham et coll., 1999): pré-sécrétoire, sécrétoire et l'étape de maturation. Toutes ces étapes peuvent être observées simultanément dans les incisives de rongeurs adultes qui se caractérisent par une croissance continue. Durant l'étape pré-sécrétoire, la pré-dentine/dentine sépare les améloblastes post-mitotiques des odontoblastes du mésenchyme (Adams et Watt, 1993). Les améloblastes, à l'étape sécrétoire produisent et sécrètent des protéines spécifiques dans la matrice de l'émail qui seront rapidement dégradées lorsque l'émail se minéralise. Les principaux composants de la matrice de l'émail synthétisés par les améloblastes fonctionnels peuvent être classés dans deux catégories majeures: les amélogénines qui composent 90% de la matrice de l'émail et les non-amélogénines comprenant l'améloblastine, l'enameline et la tufteline (Smith, 1998). Il a été suggéré que les amélogénines servent essentiellement à réguler l'épaisseur de l'émail (Fincham et coll., 1999; Moradian-Oldak, 2001). L'améloblastine, une glycoprotéine spécifique de la dent, est la protéine non-amélogénine la plus abondante (Cerny et coll., 1996 ; Fong et coll., 1996 ; Krebsbach et coll., 1996). Le niveau d'expression de l'améloblastine est à son maximum à l'étape sécrétoire et ce niveau chute au passage à l'étape de la maturation.

## ***Chapitre 3 : RESULTATS***

### **I. IMMUNOLOCALISATION DE BMP-2/-4, FGF-4 ET WNT10b AU COURS DU DÉVELOPPEMENT DENTAIRE**

---

#### ***1.1. Rappel des données et but du travail***

Au cours de l'odontogenèse, les composantes mésenchymateuses et épithéliales interagissent de façon continue et réciproque. Ces interactions à médiation matricielle contrôlent la cinétique cellulaire, l'histogenèse et la morphogenèse de l'organe de l'émail, la différenciation des odontoblastes et celle des améloblastes (Ruch, 1987). Le nombre et la distribution spatiale de ces cellules, spécifiques de chaque dent, conditionnent la forme finale de la couronne. Le développement dentaire débute classiquement par une phase d'initiation. Puis vient une phase de morphogenèse et de croissance dentaire précédant la phase de cytodifférenciation.

Depuis plusieurs années, de nombreuses études ont été menées sur l'expression de gènes codant pour des molécules de signalisation et des facteurs de croissance impliqués dans les interactions épithélio-mésenchymateuses au cours du développement dentaire. La plupart de ces molécules appartiennent à quatre familles majeures : les BMPs, FGFs, Hh et WNTs.

Dans ce travail, nous nous sommes intéressés à l'étude de quatre protéines appartenant à trois des familles citées plus haut : BMP-2, BMP-4, FGF-4 et WNT-10b. Les gènes codant pour ces protéines sont principalement exprimés au niveau du NEP, un centre de signalisation qui contrôlerait la morphogenèse coronaire.

#### ***1.2. Approches expérimentales***

##### ***1.2.1. Immunolocalisation***

Nous utilisons les souris de la souche ICR et considérons comme jour 0 de la gestation, le jour de mise en évidence du bouchon vaginal. Des têtes d'embryons sont prélevées depuis le 13<sup>ème</sup> jour jusqu'au 19<sup>ème</sup> jour du développement. Des coupes frontales sériées sont fixées à l'acétone. Après un lavage au PBS, les coupes sont incubées en présence d'eau oxygénée dans du méthanol et lavées dans du PBS. Les coupes sont incubées avec le sérum bloquant, puis avec les différents anticorps primaires : anti-BMP-2, anti-BMP-4, anti-FGF-4 et anti-WNT10b pendant la nuit à 4°C.

Après plusieurs lavages au PBS, les coupes sont incubées avec l'anticorps secondaire anti-chèvre couplé à la peroxydase (HRP), puis révélées avec la DAB et contre-colorées avec du rouge nucléaire.

#### I.2.2. Western blotting et quantification des protéines

Des molaires inférieures (E14, 15, 17 et 19), sont prélevées et homogénéisées dans un tampon de lyse comme ce qui a été décrit par Kwon et coll., (1997). La concentration en protéines est déterminée par la méthode Bradford.

Les protéines sont séparées sur un gel SDS-polyacrylamide transférées sur nitrocellulose. Les membranes sont incubées après saturation dans le TBS/Tween20/BSA1% avec les anticorps anti-BMP-2, -4, FGF-4 et WNT10b, puis lavées, et incubées avec le deuxième anticorps anti-chèvre couplé à la peroxydase et enfin révélées avec le système ECL d'Amersham. Nous avons utilisé comme protéine de référence la MAP Kinase, les bandes révélées sont scannées et la densité de chaque bande est déterminée grâce au programme NIH Image 1.63.

#### I.2.3. Etude de la prolifération cellulaire

La prolifération cellulaire est étudiée par l'analyse de la distribution des cellules en phase S après incorporation d'un analogue de la thymidine : la BrdU (Cell Proliferation Kit ; Amersham Life Science), utilisée à la dilution 1/2000 correspondant à une concentration de 1,5µg/ml dans le milieu de culture pour des marquages continus de 8, 24 et 48 hrs. L'incorporation de la BrdU est révélée par un anticorps anti-BrdU utilisé à la dilution 1/1000 (Kit Amersham), mis en évidence par un deuxième anticorps couplé à la peroxydase (anticorps anti-souris utilisé à la dilution 1/66). La révélation de la peroxydase se fait par la diaminobenzidine (DAB) et l'eau oxygénée à 3 %. Les coupes sont ensuite contre-colorées avec de l'éosine et montées dans du baume d'inclusion Eukitt.

#### I.2.4. Reconstructions tridimensionnelles

A partir de coupes histologiques sériées (5 µm), réalisées après inclusion dans la paraffine, les contours du mésenchyme et de l'EDI sont dessinés à un grossissement de 320X en utilisant un microscope Zeiss équipé d'une chambre claire. Les dessins sont ensuite numérisés à l'aide d'une caméra Hamamatsu C2400 montée sur banc optique. Ce traitement des données brutes nécessite un micro-ordinateur muni d'une carte d'acquisition de type IMPCI. L'ordinateur est relié à une station de travail graphique (Sun Ultra 1). L'acquisition et le traitement des images s'opèrent grâce à des logiciels adaptés à ce travail. Les reconstructions 3D sont visualisées à l'aide d'un programme commercial (Sun Voxel, Sun Microsystems).

### ***1.3. Résultats***

Ces travaux nous ont permis de comparer l'immunolocalisation de BMP-2, BMP-4, FGF-4 et WNT10b aux données existantes sur l'expression des gènes correspondants au cours du développement de la première molaire inférieure chez la souris. BMP-2 est présente principalement dans le mésenchyme du stade bourgeon au stade cloche et apparaît aux pôles basal et apical des cellules de l'EDI au stade de cloche tardive. BMP-4 est localisée dans le mésenchyme et l'épithélium avec un marquage des cellules du NEP situées à distance de la MB. BMP-2 et BMP-4 pourraient intervenir dans la régulation de l'apoptose au niveau de l'épithélium puis induire la différenciation des odontoblastes et des améloblastes. FGF-4 est présent dans le mésenchyme et l'épithélium, avec une localisation préférentielle au niveau de la MB. FGF-4 est supposé jouer un rôle dans la croissance des cuspidés et pourrait également stimuler la prolifération des cellules mésenchymateuses. Enfin, WNT10b est présent dans le mésenchyme et l'épithélium, avec une augmentation de l'intensité du marquage au niveau de la lèvre cervicale aux stades du capuchon et de la cloche, ainsi que dans les préaméloblastes et les cellules du SI.

Cette étude a été complétée par la recherche de l'origine des cellules en  $G_0$  du NEP au stade bourgeon (Fig. 6). Pour réaliser ce travail, nous avons fait appel au marquage continu à la BrdU, analogue de la thymidine. Au stade bourgeon, à 13 jours, le marquage continu en présence de BrdU montre la présence d'un ensemble de cellules qui ne prolifèrent plus (Fig. 6A, B, C). Après 8hrs de marquage, la longueur de la zone BrdU négative (BrdU-) est de 290 $\mu$ m (Fig. 6D), après 24hrs de marquage, on retrouve le NEP au stade de début capuchon et la longueur de la zone BrdU- diminue légèrement pour atteindre une valeur de 240 $\mu$ m (Figs. 6B, E). Pour un marquage long de 48hrs, on observe une régression remarquable de la zone BrdU- qui passe à 110 $\mu$ m de longueur (Figs. 6C, F).

### ***1.4. Conclusions***

Nos observations histologiques, ainsi que nos reconstructions 3D, montrent la présence au stade bourgeon dentaire d'un ensemble de cellules hors-cycle qui donne naissance au NEP avec un déroulement normal de l'histogenèse dentaire. Il s'agit donc bien, au stade bourgeon, d'un précurseur du NEP.

Il y a une différence entre l'expression des facteurs de croissance et la localisation des protéines correspondantes, surtout au niveau du NEP où l'expression de Bmp2 et Fgf4 est restreinte. Les résultats obtenus plaident en faveur d'un rôle de BMP-2 et -4 dans la prolifération des cellules

mésenchymateuses et d'une implication, surtout de BMP-4, dans la régulation de l'apoptose au niveau des cellules du NEP. La présence de FGF-4 aussi bien dans les cellules de l'EDI que dans celles du NEP suggère un rôle dans la prolifération épithéliale et peut être une participation dans le processus d'apoptose en synergie avec BMP-4. Une étude plus spécifique est développée plus loin pour aborder cette question (Chapitre 3. IV). La présence de WNT10b aussi bien dans l'épithélium que dans le mésenchyme, alors que le gène n'est exprimé qu'au niveau du NEP, montre que cette molécule a une action locale mais aussi à distance. Sachant que les BMPs sont des protéines diffusibles, qui peuvent être sécrétées sous une forme inactive, nous avons cherché à identifier les cellules cibles de molécules en étudiant la localisation de leurs récepteurs spécifiques.

## II. EXPRESSION DES BMPRS AU COURS DU DÉVELOPPEMENT DENTAIRE

---

### *II.1. Rappel des données*

BMP-2 et BMP-4 ont des effets divers et quelquefois paradoxaux pendant le développement embryonnaire. Ils peuvent induire ou stimuler des activités cellulaires différentes telles que la prolifération cellulaire, la différenciation et/ou l'apoptose (Onishi et coll., 1998 ; Wordinger et coll., 2002). Les BMPs agissent par le biais de récepteurs membranaires (type I et type II) à activité kinase en induisant leur dimérisation. Trois récepteurs de type I (BMPR-IA, - IB et ActR-I), et deux récepteurs de type II (BMPR-II et ActR-II) ont été identifiés. BMPR-II peut se lier seul à BMP-2, BMP-4 et BMP-7, mais l'activation du récepteur nécessite la dimérisation avec un récepteur de type I. En dépit de son nom, BMPR-II est le récepteur initial alors que le type I agit comme un substrat de la signalisation (von Bubnoff et Cho, 2001). Selon le ligand, BMPR-II diffère dans sa capacité à interagir avec les trois récepteurs de type I et les dimères résultants diffèrent dans leur potentiel de signalisation (Liu et coll., 1995). Dans plusieurs modèles différents (ostéoblastes ou chondrocytes), il a été montré que les effets des BMPs sur la prolifération cellulaire sont relayés par BMPR-IA, alors que le signal de différenciation cellulaire se fait au moyen de BMPR-IB (Onishi et coll., 1998 ; Panchision et coll., 2001).

### *II.2. But du travail*

Un certain nombre de données existent sur l'expression et les fonctions attribuées aux différentes BMPs pendant le développement dentaire, alors que l'expression de leurs récepteurs a été beaucoup moins étudiée. Seules des données sur BMPR-IA ont été publiées (Dewulf et coll., 1995 ; Andl et coll., 2004). Dans ce contexte les cellules cibles pour les BMPs n'ont pas été clairement identifiées. Pour mieux comprendre où et quels récepteurs sont impliqués dans les cascades déclenchées par BMP-2 et -4, nous avons cherché à localiser les trois récepteurs spécifiques de BMP-2 et -4, à savoir BMPR-IA, BMPR-IB et BMPR-II, dans des ébauches dentaires au cours du développement du stade bourgeon jusqu'à la cytodifférenciation des odontoblastes et des améloblastes.

## ***II.3. Conditions expérimentales***

### ***II.3.1. Immunolocalisation***

L'immunolocalisation de BMPR-IA, BMPR-IB et BMPR-II a été réalisée à l'aide du kit ABC vectastain. Toutes les coupes ont été contre-colorées avec l'hématoxyline.

### ***II.3.2. RT-PCR***

Pour l'analyse de l'expression de Bmprs, nous avons fait appel à la détection semi-quantitative (RT-PCR). Pour cela l'ARN total a été extrait des premières molaires inférieures, de l'épithélium dentaire, de l'épithélium oral et du mésenchyme à E14, en utilisant le kit RNeasy (Qiagen). Nous avons utilisé les primers suivants :

5'-CTCATGTTCAAGGGCAG-3' et 5'-CCCCTGCTTGAGATACTA-3' (53.2°C) pour BMPR-IA, 5'-ATGTGGGCACCAAGAAG-3' et 5'-CTGCTCCACCCAATGCT-3' (50.9°C) pour BMPR-IB, 5'-GTGCCCTGGCTGCTATGG-3' et 5'-TGCCGCCTCCACATGTT-3 (54.4°C) pour BMPR-II et 5'-TTG TTGGAATTTGAAATTCCAGACAAG-3' et 5'-GCATTTAAAAGGAACTGTTGA CAAG-3 (52°C) pour HPRT.

Pour compléter les résultats obtenus par la RT-PCR et l'immunolocalisation au stade de capuchon dentaire, nous avons cherché à vérifier l'absence de BMPR-II au niveau de l'épithélium dentaire en réalisant un western blot sur l'épithélium dentaire isolé, sur l'épithélium oral et sur un mésenchyme dentaire dissocié.

## ***II.4. Résultats et conclusions***

Pendant le développement dentaire, les BMPs peuvent réguler aussi bien la prolifération, la différenciation et l'apoptose. Au stade bourgeon, le dimère BMPR-IA/II servirait de médiateur aux effets de BMP-2 dans l'épithélium dentaire pendant que, dans le mésenchyme, le dimère BMPR-IB/II servirait de médiateur des effets de BMP-4 dans la condensation et la prolifération cellulaire. Au stade capuchon, BMPR-IB a été détecté dans l'épithélium contrairement à BMPR-II, nous faisons l'hypothèse de l'existence d'un autre récepteur de type II pour former un dimère fonctionnel. A E15, BMPR-IA et -II ont une distribution hétérogène dans le mésenchyme, semblable à celle de BMP-4. Les trois molécules se sont concentrées dans les régions où les cuspides commenceront à se former 24hrs plus tard. Dans l'épithélium, la distribution de BMP-4, BMPR-IA et -II est restreinte à la partie interne du NEP et dans le gubernaculum, deux régions où les apoptoses sont très nombreuses. Au stade de cloche tardive, le dimère BMPR-IB/II peut servir de médiateur dans la signalisation par



BMP-2 ou -4, dont on connaît la capacité à induire la différenciation des odontoblastes alors que BMPR-IA/-II jouerait le même rôle pendant la différenciation des améloblastes.

Nos résultats fournissent une première évidence de l'existence de plusieurs types de récepteurs de type II pour les BMPs exprimés dans l'épithélium dentaire et, au niveau du mésenchyme, aux différents stades du développement dentaire et ainsi leur participation dans différentes activités cellulaires.

### III. L'HISTOMORPHOGENESE EPITHELIALE *IN VITRO*

---

#### ***III.1. Rappel des données et but du travail***

La transition bourgeon-capuchon est accompagnée d'une histomorphogenèse de l'organe de l'émail avec principalement la mise en place du NEP et la ségrégation plus tardive des cellules de ce NEP au contact de la membrane basale en NES aux sommets des cuspidés (Coin et coll., 1999a). C'est aussi au stade de capuchon que commencent à se distinguer l'EDI, l'EDE et le RS. Toutes ces étapes impliquent des activités mitotiques différentielles, des phénomènes d'apoptose, d'adhésion et de ségrégation cellulaires. La coordination de ces activités nécessite des informations de position des différents composants de l'organe de l'émail et ce au niveau cellulaire (Hu et coll., 2005a, b).

Plusieurs études ont montré que cette histomorphogenèse épithéliale était accompagnée de changements : 1) dans la composition de la MB (Yoshida et coll., 1998, 2000), partiellement régulée par les métalloprotéinases (MMPs) et leurs inhibiteurs (Yoshida et coll., 2003). 2) dans l'expression de récepteurs impliqués dans les interactions cellule-matrice: les intégrines (Salmivirta et coll., 1996 ; Lesot et coll., 2002), ou de molécules d'adhésion cellule-cellule telles que les cadhérines (Fausser et coll., 1998 ; Obara et Lesot, 2004). 3) dans les patrons d'expression de molécules de signalisation dans l'épithélium et le mésenchyme (Nadiri et coll., 2004).

Des réassociations hétérotopiques entre un mésenchyme dentaire isolé et un organe de l'émail, ont montré qu'au cours de la transition bourgeon-capuchon, le potentiel odontogène passe de l'épithélium vers le mésenchyme qui contrôlerait le développement et la morphogenèse de la couronne (Kollar et Baird, 1970 ; Schmitt et coll., 1999). Il a été montré que le NEP contrôlerait la cuspidogenèse et que la forme de la couronne dépendrait de l'origine du mésenchyme (molaire supérieure ou molaire inférieure), ce qui permet de penser que le mésenchyme contrôle la formation et/ou module la fonction du NEP au cours du développement dentaire (Schmitt et coll., 1999). Toutefois la question se pose de savoir jusqu'à quel point le mésenchyme est capable d'induire l'histogenèse épithéliale, y compris la mise en place d'un NEP fonctionnel.

Pour tenter d'y répondre, Hu et coll. (2005a, b) ont réalisé des réassociations entre mésenchyme dentaire et cellules isolées de l'organe de l'émail de la première molaire inférieure, complètement dissociées au stade capuchon. Après plusieurs jours de culture, il y a formation d'une dent *in vitro* (Annexes 1 et 2). Après 12hrs de culture, la jonction épithélio-mésenchymateuse est

restaurée. Toutes les cellules épithéliales sont semblables de même taille avec une forme arrondie. Après 24hrs de culture, l'épithélium s'est organisé sous forme de bourgeon avec deux populations cellulaires. Les cellules internes restent petites et rondes alors que les cellules en contact avec la MB commencent à s'allonger. Après 2 jours de culture, l'épithélium atteint le stade de transition bourgeon-capuchon. Après 3 jours de culture, les réassociations se présentent sous forme de capuchon avec une histogenèse épithéliale caractéristique. En particulier un groupe de cellules se condense dans la partie centrale de l'EDI, avec la même organisation que les cellules du NEP *in vivo*. Des tests d'incorporation de BrdU montrent que ce groupe de cellules ne prolifère pas : cette région reste BrdU-. Après plusieurs jours de culture, la représentation en 3D de la forme des réassociations montre la formation de six cuspides (Hu et coll., 2005a, b), situation proche des sept cuspides caractérisant la première molaire inférieure, si on tient compte de la petite taille et du développement tardif de la 7<sup>ème</sup> cuspide (Viriot et coll., 1997).

Etant donné le rôle prêté au NEP dans le contrôle de la cuspidogenèse, il faut en conclure que celui qui apparaît dans les réassociations en culture est bien fonctionnel. Pour savoir si cette structure partage d'autres caractéristiques avec le NEP *in vivo*, nous avons cherché l'expression de Shh et la localisation des apoptoses au niveau des cellules de cette structure.

L'histogenèse épithéliale *in vivo* s'accompagne de patrons spécifiques d'expression aussi bien pour les gènes codant pour des molécules de signalisation qui stimulent la prolifération ainsi que la différenciation, que pour les récepteurs des protéines correspondantes (Thesleff, 2002). Partant de là, et sachant que les Wnts stimulent une multitude de cascades tels que l'adhésion cellulaire, la prolifération et peuvent aussi interagir avec d'autres facteurs de croissance aussi important au cours du développement tels que les FGFs et les BMPs (Kratowchwil et coll., 2002 ; Kleber et coll., 2005) . Pour cela nous nous sommes intéressés à l'étude de WNT5a, WNT10b et leur récepteur Fz dans un système complètement perturbé et qui nécessite une restauration de système moléculaire indispensable à un développement normal (adhésion, prolifération et différenciation).

Les FGFs constituent une cible directe des Wnts, spécialement FGF-4 qui est directement stimulé par le complexe LEF-1/ $\beta$ -caténine, un médiateur de WNT10 au stade capuchon (Schéma 2). Pour cette raison, nous avons également essayé de localiser la  $\beta$ -caténine et la protéine FGF-4 dans les réassociations après 3j de culture correspondant au stade de capuchon dentaire.

## ***III.2. Approches expérimentales***

### III.2.1. Préparation des tissus et des cultures

Des molaires inférieures d'embryons de souris au stade du capuchon (E14) et au stade du bourgeon (E13) ont été dissociées par traitement avec la trypsine afin de séparer le mésenchyme de l'épithélium, l'épithélium étant à son tour dissocié en cellules isolées. Ces cellules sont réassociées avec le mésenchyme dentaire et mises en culture pour des durées allant de 12hrs à 4 jours.

### III.2.2. Localisation des apoptoses en whole-mount

#### ➤ Fixation

Les explants sont fixés pendant 2hrs dans du paraformaldéhyde (PFA) à 4% dans du PBS, suivi d'un lavage avec le PBT (PBS-0,1%Tween20) et un lavage dans le méthanol (MeOH) (100%).

#### ➤ Réhydratation

Les échantillons sont réhydratés durant 5min dans des bains décroissants de 5min chacun de MeOH (75%, 50% et 25%),

#### ➤ Protéinase K

Le traitement est de 20min avec la protéinase K (10micrg/ml). La réaction est stoppée par la glycine (2mg/ml) dans le PBT. Plusieurs lavages dans le PBT sont suivis d'une fixation dans un mélange PFA 4% et glutaraldéhyde 0,25% dans le PBS et de lavages 2x2hrs avec le PBT contenant 0.1%Triton (PBTT).

#### ➤ Réaction TdT

Les explants sont incubés pendant 1hr dans le tampon d'équilibrage (Equilibration Buffer (Apoptag, Chemicon, S7106)), puis toute la nuit à 4°C dans le tampon de réaction contenant l'enzyme TdT (15µl de TdT, (Apoptag, Chemicon, S7107) + 85µl Reaction buffer (Apoptag, Chemicon, S7105)). Les échantillons sont lavés 2hrs à 37°C avec le tampon de réaction. Cette réaction est arrêtée par la solution Stop (Apoptag, Chemicon, S7108) pendant 40min à 37°C. Les échantillons sont enfin lavés 6x1hr dans le PBTT à température ambiante, et un lavage qui dure toute la nuit à 4°C. Une inactivation par la chaleur est faite dans le TBSTT pendant 40min à 60°C.

#### ➤ Incubation d'anticorps

La saturation est réalisée en incubant les explants pendant 2hrs en présence de 10% de sérum normal de chèvre, 1%BSA dans du PBS. Les échantillons sont incubés toute la nuit à 4°C avec l'anticorps anti-Digoxigénine couplé à la phosphatase alcaline (AP), (1/2000, Boehringer

Mannheim, Germany). Les explants sont alors lavés avec du TBS contenant 0,1 % Tween20 et 0,1% Triton pendant 3 jours.

➤ Coloration

Après un lavage dans le NTMT, la révélation est réalisée avec le NTMT+ 1,4µl NBT+ 1,1µl BCIP, cette réaction est stoppée avec du PTW. Les échantillons peuvent être conservés dans le glycérol 50 %, PFA 2 % dans le PTW-EDTA à 4°C.

III.2.3. Localisation de ssDNA

L'apoptose est détectée sur des coupes au cryostat (7µm) à l'aide d'un anticorps anti-ssDNA (1/ 250 ; DAKO), suivi d'une révélation en utilisant le kit ABC vectastain. Les coupes sont contre-colorées avec le rouge nucléaire ou avec l'hématoxyline 25 %.

III.2.4. Expression de Shh

Les molaires issues de recombinaisons après 3j de culture, sont coupées après congélation et fixées dans le paraformaldéhyde 4% PBS. Les transcrits anti-sens Shh, sont produits à partir d'ADNc cloné dans le vecteur pBluescript (don du Prof Andrew McMahon, Université de Harvard, Boston), linéarisé avec Eco RI et transcrit par l'ARN polymérase T7. L'hybridation est réalisée avec quelques modifications selon Echelard et coll. (1993).

III.2.5. Immunolocalisation de molécules de signalisation

Les molaires obtenues par recombinaison après 3j de culture sont fixées dans l'OCT et congelées à -20°C. Des coupes frontales de 7µm sont réalisées au cryostat. Les coupes sont fixées à l'acétone pendant 10min, après 3 lavages au PBS, les coupes sont saturées avec la BSA (1 %) dans le PBS et incubées toute la nuit à 4°C avec les anticorps primaires: anti-WNT-5a (1/100; R&D systems), anti-WNT-10b (1/150; Santa Cruz, CA), anti-Frizzled (1/150; Santa Cruz, CA), anti-β-caténine (1µg/ml; Biosource) et anti-FGF4 (1/ 150; Santa Cruz, CA). Après plusieurs lavages, les coupes sont incubées avec les anticorps secondaires : anti-goat-Alexa-488 ou anti-rabbit-Alexa-594 et ensuite lavées et incubées pendant 2min avec du Hoechst suivi d'un lavage de 10min dans le PBS. Le montage des lames est réalisé avec du permafluor (DAKO). Le même protocole est réalisé en parallèle sur des molaires inférieures à E14.

### **III.3. Résultats**

#### **III.3.1. La formation du NEP**

Après 12hrs de culture, l'apoptose est encore fréquente dans les réassociations entre le mésenchyme dentaire et les cellules épithéliales (Fig. 7A), mais elle diminue très vite au cours du développement *in vitro* (Figs.7A-E). La plupart des apoptoses a disparu après 24hrs de culture (Fig. 7B), ce qui confirme les observations histologiques (Hu et coll., 2005a, b). Après 48hrs de culture, l'histogenèse épithéliale débute : on observe la mise en place de l'EDI, de l'EDE et du RS. Après 72hrs, l'histogenèse épithéliale continue avec la progression du RS (Fig. 8A). Les coupes histologiques montrent une réorganisation des différents compartiments épithéliaux avec la mise en place du NEP *in vitro* si on en juge 1) par l'organisation cellulaire (Fig. 8A), 2) par les apoptoses qui se concentrent dans cette région et affectent principalement les cellules à distance de la MB (Fig. 8B) et enfin 3) par l'expression de Shh (Fig. 8C), un marqueur exprimé *in vivo* uniquement par les cellules du NEP au stade capuchon.

#### **III.3.2. Expression de molécules de signalisation**

##### **a. WNTs et leur récepteur**

Au niveau des recombinaisons, après 3j de culture, WNT5a et Fz présentent les mêmes distributions au niveau de l'organe de l'émail que dans les molaires inférieures (comparer les Figs. 9A et B aux Figs. 9D, E). Les deux protéines montrent une association à la MB et un marquage plus intense au niveau des cellules du NEP. Au même stade, Fz présente un marquage plus faible au niveau des recombinaisons par rapport à la molaire inférieure et généralement le marquage épithélial est plus important que le marquage mésenchymateux. Le marquage présenté par les deux molécules au niveau du mésenchyme est plus faible par rapport au marquage épithélial. La protéine WNT10b est complètement absente de l'épithélium dentaire dans les recombinaisons, contrairement à sa distribution au niveau de la molaire, où elle est présente au niveau de l'organe de l'émail à l'exception de l'ensemble des cellules du NEP, et un fort marquage dans la LC (région riche en mitoses), mais aucune association à la MB.

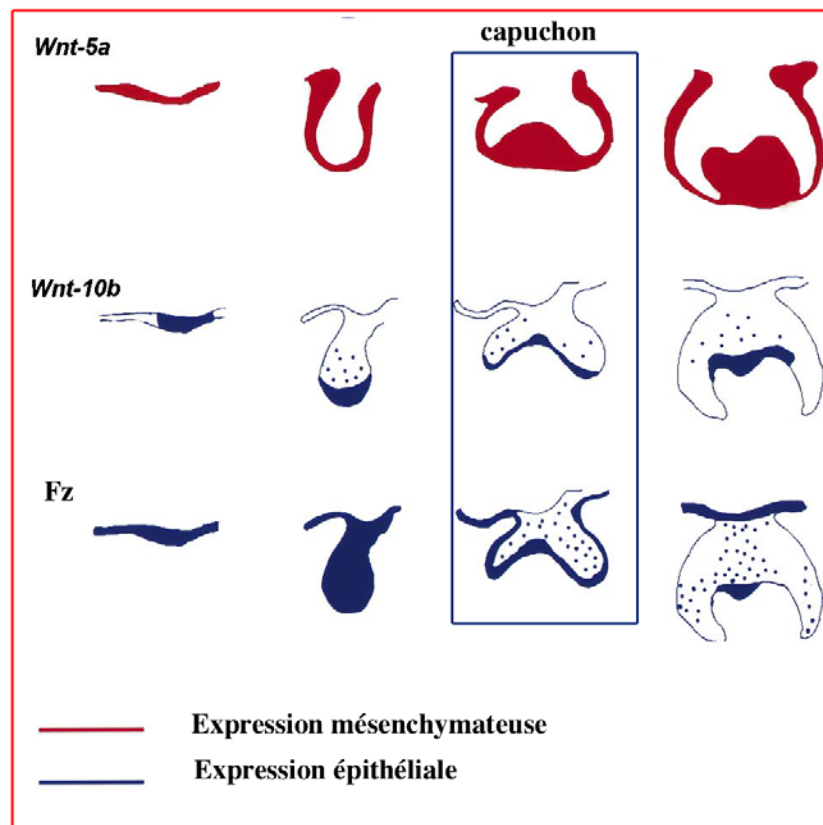
##### **b. $\beta$ -caténine et FGF4**

Au niveau des recombinaisons, la  $\beta$ -caténine est présente aussi bien dans les cellules de l'EDE que dans les cellules de l'EDI, mais ne donne lieu à aucun marquage au niveau du mésenchyme dentaire (Fig. 10A). FGF-4 montre un marquage semblable à celui de WNT10b au niveau des

réassociations ; absent de l'épithélium dentaire. Dans la molaire inférieure, FGF-4 montre un fort marquage au niveau de la MB, ce marquage n'est plus retrouvé au niveau des réassociations (Fig. 10B).

### **III.4. Discussion**

Au stade de capuchon dentaire (E14), les gènes *Wnt10b* et le récepteur *Fz* sont exprimés au niveau des cellules épithéliales avec une concentration au niveau des cellules du NEP, une forte expression de *Wnt10b* dans l'EDE et une faible expression au niveau de l'EDI. *Wnt5a* est exclusivement exprimé au niveau du mésenchyme (Sarkar et Sharpe, 1999).



**Schéma 1: Expression de *Wnt5a*, *Wnt10b* et *Fz* au cours du développement dentaire (Sarkar et Sharpe, 1999)**

Par rapport à l'expression des gènes (Schéma 1), l'immunolocalisation des protéines correspondantes aussi bien au niveau des réassociations *in vitro* qu'au niveau de la molaire inférieure montre une distribution spatiale différente qui peut être en partie due à leur interaction avec les

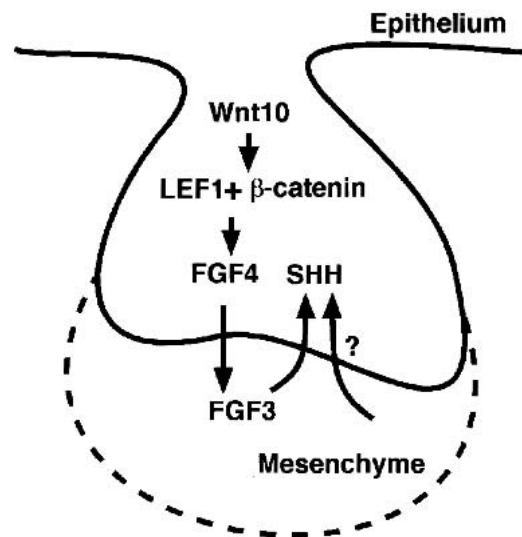
HSPGs. Le rayon d'action des différents membres de la famille des Wnts dépend de plusieurs composants : 1) la distribution et la concentration des récepteurs des Wnts et co-récepteurs déterminant la région où les protéines peuvent activer leurs cascades (He et coll., 2004 ; Hsieh, 2004) 2) la concentration en antagonistes telles que Dkk et Cerberus (Niehrs, 1999), et enfin 3) la composition de l'environnement en HSPGs. Les HSPGs sont nécessaires pour l'expression de Xwnt8 au niveau du mésoderme chez *Xenopus* (Itoh et Sokol, 1994). Plus récemment, il est devenu évident que wnt chez la drosophile (*wg*) est associé directement avec l'héparine (Riechman et coll., 1996). Lin et Perrimon (2002) ont proposé trois modèles différents pour expliquer l'action des HSPGs sur la famille des Wnts. En se liant aux Wnts, les HSPGs réduiraient leur diffusion et augmenteraient les concentrations en Wnts localement. Dans un deuxième modèle, les HSPGs moduleraient l'action des Wnts par une action au niveau des cellules réceptrices en interagissant avec les Wnts qui sont ainsi immobilisés. Dans le troisième modèle, les HSPG sont impliqués dans le transport des Wnts et ainsi permettraient une action à distance. L'association de WNT5a à la MB peut être expliquée par le rôle joué par les HSPGs au cours du développement.

Un apport exogène en BMP4 diminue l'expression de *Fgf8* et *Wnt5a*, avec une augmentation des apoptoses et une diminution de la prolifération cellulaire (Suzuki et coll., 2003). Chez les mutants *noggin*, il y a une chute de l'expression de *Wnt5a*. Ces deux approches expérimentales montrent que certains gènes de la famille des Bmps, essentiellement *Bmp4*, exercent un effet négatif sur l'expression de *Wnt5a* et cela est visible par la modulation des apoptoses et la prolifération cellulaire. Alors que l'augmentation des apoptoses peut s'expliquer par un effet direct de BMP4, la diminution de la prolifération cellulaire peut en fait résulter d'inhibition de la transcription de *Wnt5a* sous l'effet de BMP-4. En effet, chez les souris mutantes *Wnt5a*<sup>-/-</sup>, la prolifération cellulaire diminue dans certaines régions (Yamaguchi et coll., 1999), alors qu'elle augmente au niveau des poumons, ceci suggère l'existence d'effets tissu-spécifiques dans la signalisation de WNT5a. Au niveau de l'EDI, la présence de WNT5a, WNT10b et de leur récepteur permet de penser que ces molécules interviennent dans la prolifération de ces cellules surtout dans la LC où l'activité mitotique est élevée.

La signalisation épithéliale des Wnts peut induire une expression mésenchymateuse de FGF, intervenant dans les interactions épithélio-mésenchymateuses. Inversement, chez les souris *Fgfr1*<sup>-/-</sup>, il a été montré que FGF pourrait aussi réguler la voie canonique Wnt/ $\beta$ -caténine (Ciruna et Rossant, 2001). Donc, les signalisations par FGF ou Wnt sont susceptibles d'interférer dans les deux sens. Au cours du développement dentaire, il a été montré que Wnt pouvait moduler de nombreux gènes (Nusse, 1999; Noort et Clevers, 2002), dont quelques uns seulement ont été identifiés comme cibles



directes. C'est en particulier le cas de Fgf4, qui est capable de restaurer le développement dentaire chez des souris Lef1<sup>-/-</sup>. Pour autant l'apport exogène de FGF-4 n'augmente pas l'expression ni de Wnt10a ni celle de Wnt10b. L'activation de FGF-4 par Wnt passe par une activation du complexe LEF1/β-caténine (Kratochwill et coll., 2002, Schéma 2). La signalisation par FGF n'est pas nécessaire à une expression élevée de Wnt10a et Wnt10b dans les germes dentaires chez les souris Lef1<sup>-/-</sup>. Cela ne permet pas pour autant d'éliminer la possibilité que l'initiation de l'expression des gènes Wnts puisse être régulée par les FGFs.



**Schéma 2: La voie d'action de Wnt10 au stade capuchon dentaire (Kratochwill et coll., 2002).**

L'absence simultanée de WNT10b et FGF-4 dans l'épithélium dentaire des molaires issues de réassociations *in vitro* renforce l'hypothèse selon laquelle FGF4 est une cible directe de Wnt10. La présence de la β-caténine dans l'organe de l'émail ne nous apporte aucune information car c'est l'accumulation cytoplasmique de la β-caténine et sa translocation dans le noyau qui est une conséquence et une réponse à la signalisation par les Wnts au niveau épithélial. Le fait que le développement des réassociations se fasse correctement et aboutisse à la formation d'une dent *in vitro*, laisse entrevoir la possibilité que d'autres molécules de la famille des FGFs compensent l'absence de FGF-4 au niveau épithélial pour permettre la formation des cuspidés.

L'ensemble de ces résultats confirme le rôle du mésenchyme au stade capuchon dans le contrôle de la morphogenèse dentaire et montre pour la première fois qu'il contrôle la restauration de l'histogenèse épithéliale complètement perdue après destruction des organes de l'émail en cellules isolées. Cela aboutit à la restauration de l'EDE et l'EDI, séparés par un RS et la mise en place d'un

centre de signalisation transitoire fonctionnel contrôlant la cuspidogenèse. Pour autant, il demeure certaines variations qualitatives dans la signalisation au sein de l'organe de l'email.

## IV. DOUBLE RÔLE DE FGF-4 AU COURS DU DÉVELOPPEMENT DENTAIRE

---

### ***IV.1. Introduction***

On a toujours attribué un rôle mitogène à tous les FGFs étudiés dans les tissus dentaires. En particulier, FGF-4 et FGF-9, d'origine épithéliale, stimuleraient la prolifération cellulaire au niveau de l'épithélium dentaire et du mésenchyme, alors que FGF-10 stimulerait spécifiquement la prolifération cellulaire épithéliale (Kettunen et coll., 1999). Par contre, au cours du développement du bourgeon du membre, c'est l'induction de l'apoptose par les BMPs qui nécessiterait la présence de FGFs (Montero et coll., 2001). L'immunolocalisation de FGF-4 au cours du développement dentaire a montré sa présence au niveau de l'organe de l'émail, y compris dans le NEP, riche en apoptoses et où les cellules ne se divisent pas. FGF-4 et -10 se lient aux deux récepteurs membranaires FGFR-1 (Flg) et FGFR-2 (bek), cette interaction étant modulée par l'héparane sulfate (HS) (Mansukhani et coll., 1992 ; Ornitz et coll., 1996 ; Aviezer et coll., 1999). La concentration et la disponibilité en HS modulent la liaison des FGFs aux différents récepteurs.

Ces données nous ont conduit à réévaluer le rôle de FGF-4 au cours du développement dentaire. Nous avons procédé à des tests fonctionnels *in vitro* sur des premières molaires inférieures et des mésenchymes dissociés de ces molaires, prises au stade du capuchon. Pour ce faire nous avons inséré dans les organes/tissus des billes imprégnées de solutions contenant soit FGF-4 soit BMP-4, les solutions contrôle contiennent la BSA, et les avons cultivés pendant des périodes allant de 12hrs à 48hrs. Après arrêt des cultures, nous avons procédé à la détection des apoptoses sur les molaires entières par la méthode Tunel et analysé l'expression de Msx2 sur des mésenchymes dissociés. Par ailleurs, la localisation des récepteurs de FGF-4 sur des molaires prélevées au même stade nous a permis d'identifier les cibles de ce facteur de croissance dans le processus d'apoptose.

### ***IV.2. Méthodes utilisées***

#### ***IV.2.1. Immunolocalisation***

Des têtes d'embryons de souris sont prélevées au 14<sup>ème</sup> jour du développement embryonnaire. Des coupes frontales sériées sont fixées à l'acétone. Après un lavage au PBS, les coupes sont saturées avec le sérum normal de chèvre (NGS), puis incubées toute la nuit à 4°C avec les différents anticorps primaires : produits soit chez la chèvre, FGF4 (1/100), FGF10 (1/100), FGFR-2 (1/150),

soit chez le lapin FGFR-1 (1/50). Tous les anticorps sont de chez Santa-Cruz, CA. Les coupes incubées avec l'anticorps anti-FGFR-1 sont traitées auparavant avec la hyaluronidase. Après plusieurs lavages au PBS, les coupes sont incubées 1h avec les anticorps secondaires, anti-chèvre couplé à l'Alexa-488 (1/1000; Molecular probes) et anti-lapin couplé à l'Alexa-586 (1/150; Molecular probes). Elles sont lavées dans du PBS et incubées pendant 40 s avec du Hoechst suivi d'un lavage de 10min dans du PBS. Le milieu de montage est du permafluor (DAKO).

#### IV.2.2. Culture en présence de billes

Des molaires inférieures prélevées à E14 sont cultivées pendant des périodes de 12hrs jusqu'à 48hrs en présence de : 1) de billes Affigel blue (75-150 Mesh; Bio Rad) incubées en présence de la protéine BMP-4 (R&D systems; 100ng/μl), ou 2) de billes d'héparine (200 mesh, Sigma) imprégnées de la protéine FGF-4 (R&D Systems, 100ng/μl). Les billes sont déposées au niveau du mésenchyme du côté lingual des molaires. Pour les contrôles, les billes ont été préincubées avec de la BSA/PBS (100ng/μl). Sur le même principe, des mésenchymes dentaires isolés au stade de capuchon sont cultivés pendant 48hrs en présence de : 1) des billes d'héparine imprégnées de la protéine FGF-4 avec ou sans inhibiteur Su5402 rajouter dans le milieu de culture (50mM, VWR), pour les contrôles sont incubées en présence de billes imprégnées avec BSA avec DMSO dans le milieu de culture.

#### IV.2.3. Analyse de l'apoptose par la méthode Tunel en whole-mount

La technique utilisée est la même que celle utilisée pour la détection de l'apoptose dans la partie 3.2.2.

#### IV.2.4. L'hybridation in situ en whole-mount

L'hybridation *in situ* est réalisée sur les explants selon plusieurs étapes :

- Fixation en présence du PFA 4% dans PBS (2hrs),
- Lavages dans le PBT (PBS avec 0,1% Tween 20),
- Déshydratation dans du méthanol (25 %, 50 %, 75 % et 100 %) et conservation à -20°C jusqu'à utilisation,
- Réhydratation des échantillons,
- Lavage au PBT,

- Traitement par 6 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dans le PBT, 1h à température ambiante (TA),
- 3 lavages au PBT,
- Traitement avec la Protéinase K diluée dans le PBT (10 µg/ml), 10min,
- Lavage à la glycine à 2 mg/ml dans le PBT,
- Lavages PBT,
- Post-fixation avec le mélange PFA 4%, 0.2% glutaraldéhyde dans le PBT pendant 20min,
- Incubation dans le tampon de pré-hybridation 1h à 65°C,
- Lavage au PBT,
- Incubation sous agitation toute la nuit à 4°C avec la sonde Msx-2 couplé à la DiG à la concentration 1µg/ml,
- Lavage 2x30min à 65°C dans la solution 1 (50 % formamide déionisée, 5xSSC, 1 % SDS),
- Lavage de 10 min à 65°C dans un mélange de solution 1 et solution 2 (0.5 % M NaCl, 10mM Tris-HCl, pH7.5, 0.1 % Tween-20) (1:1),
- Lavage 3x5min solution 2 à TA,
- Incubation 2x30min RNase A à 10µg/ml, dilué dans la solution 2 à 37°C,
- Lavage dans la solution 2,
- Lavage dans la solution 3 (50 % formamide déionisée, 2xSSC) à TA,
- Lavage dans solution 3, 2x30min à 65°C,
- Saturation de 1h dans de la BSA 1 % dans du TBS en présence de 2mM de lévamisole,
- Incubation toute la nuit à 4°C avec l'anticoprs secondaire Anti-DiG (1/1000), couplé à la AP (Phosphatase alcaline),

- Lavages au TBST,
- Lavages au NTMT contenant le lévamisole 2mM,

Incubation avec la solution de révélation NTMT+ 1,4 $\mu$ l+ NBT+ 1,1 $\mu$ l BCIP, cette réaction est stopée avec PTW. Les échantillons peuvent être conservés dans le glycérol 50 %, PFA 2 % dans le PTW-EDTA à 4°C,

### ***IV.3. Résultats***

Au niveau de la molaire inférieure, les protéines FGF-4 et FGFR-1 sont présentes dans l'EDI et l'EDE et ainsi que dans le mésenchyme dentaire, où le marquage est moins important que dans l'organe de l'émail (Fig. 11). Un fort marquage pour FGF-4 est associé à la MB (Fig. 11). FGF-10 et FGFR-2 sont tous deux exclusivement présents au niveau des cellules internes du NEP. Cette co-localisation est retrouvée aussi au niveau du gubernaculum, régions riches en apoptoses (Fig. 11).

Lorsque des billes/BSA sont appliquées sur des molaires en culture, l'apoptose est surtout présente en périphérie des échantillons, cette apoptose est probablement due aux traumatismes consécutifs des prélèvements et à des mises en culture (Fig. 12). Après application de billes/BMP-4 pendant 12hrs, on remarque que l'apoptose augmente dans les germes dentaires (Fig. 12). A l'inverse l'apoptose diminue considérablement pour les intervalles courts (12hrs) sous l'effet de FGF-4 (Fig. 12). Après 48hrs de culture en présence de BMP-4, l'apoptose est encore plus importante qu'après 12hrs (Fig. 12). De plus l'apport exogène en FGF-4, toujours après 48hrs de culture entraîne aussi une forte augmentation de l'apoptose par rapport à ce qui était observé après 12hrs (Fig. 12).

Le mésenchyme, région où il n'y a pas d'apoptose et n'exprime pas Msx2 (Fig.13), l'application de FGF-4 sur un mésenchyme dentaire en culture stimule l'expression de Msx2 (Fig. 13). Inversement, l'application d'un inhibiteur spécifique de FGFR (Su5402), inhibe cette expression de Msx2 au niveau du mésenchyme dentaire (Fig. 13).

### ***IV.4. Discussion***

Il est communément admis que l'apoptose contrôle le nombre de cellules et intervient dans la morphogénèse. Par exemple, dans le rein, Coles et coll. (1993) ont proposé que l'apoptose est associée à la différenciation cellulaire et régule le nombre des cellules épithéliales et mésenchymateuses. L'apoptose n'est apparemment pas seulement impliquée dans le contrôle de la taille des organes, mais participe également à la morphogénèse au travers de l'élimination de cellules

spécifiques. Au cours du développement dentaire, l'apoptose est principalement détectée dans les cellules épithéliales dès le stade de bourgeon spécialement au sommet du bourgeon. Cette mort cellulaire a d'abord été considérée comme nécessaire à la morphogenèse dentaire et spécialement au phénomène de la cuspidogenèse, car une concentration de cellules apoptotiques a été détectée dans le NEP, structure régulant la cuspidogenèse et responsable de la formation des NES aux sommets des cuspidés. Cependant des tests fonctionnels d'inhibition de l'apoptose réalisés au stade de capuchon dentaire n'ont entraîné qu'une accumulation de cellules épithéliales (normalement éliminées) ce qui malgré tout reste sans conséquence sur le bon déroulement de l'histomorphogenèse (Coin et coll., 1999b). Dans la dent, l'apoptose a été associée avec l'expression de plusieurs facteurs de croissance et de transcription différents spécifiques comme: Bmp-2, Fgf4, Egr-1, N-myc, c-fos, Msx-2 et Bcl-2 (Hirning et coll., 1991; Karavanova et coll., 1992 ; MacKenzie et coll., 1992 ; Smeyne et coll., 1993 ; Sloodweg et de Weger, 1994). Certains auteurs ont conçu que Msx2, intervenait nécessairement dans l'apoptose induite par BMPs (Graham et coll., 1994 ; Chen et Zhao, 1998).

L'administration exogène de FGF-4 pendant une courte période inhibe les apoptoses dans la molaire, ce qui est en accord avec des observations antérieures sur le bourgeon du membre (Macias et coll., 1996). De plus, l'administration simultanée de FGFs et de BMPs dans le mésoderme du membre bloque l'apoptose observée quand les BMPs sont administrés seules (Gañan et coll., 1996 ; Buckland et coll., 1998). Chez les souris présentant une déficience dans l'expression des Fgfs, on remarque une diminution et un changement dans la distribution spatiale de la mort cellulaire programmée (Partanen et coll., 1998 ; Heymer et Ruther, 1999). En accord avec ces faits, nos observations après application des billes contenant FGF-4, après 48hrs, coïncident avec une augmentation de la concentration en apoptoses ainsi que la stimulation de l'expression de Msx2 dans le mésenchyme (Fig. 13). Cette stimulation est inhibée par une application simultanée de Su5402 et de FGF4. Su5402 inhibe la signalisation des FGF en se liant avec le domaine catalytique de ses récepteurs et spécialement FGFR1 (Mohammadi et coll., 1997). La spécificité de cet inhibiteur est confirmée par l'absence de son effet sur les récepteurs des EGFs ou sur les récepteurs des PDGFs (Mohammadi et coll., 1997).

Nos observations apportent de nouvelles informations sur l'existence d'interactions moléculaires entre FGFs et BMPs dans le contrôle du développement dentaire. En outre, nos résultats indiquent que FGFs et BMPs sont nécessaires à l'expression de Msx2. Ces conclusions suggèrent un rôle coopératif des FGFs avec les BMPs dans la régulation de gènes impliqués dans la cascade moléculaire conduisant à l'apoptose.

## Chapitre 4: Discussion & Perspectives

La première molaire inférieure de souris est un modèle largement utilisé dans l'étude des interactions épithélio-mésenchymateuses qui contrôlent l'histogenèse, la morphogenèse et les cytodifférenciations. La morphogenèse des molaires et des incisives des souris ICR ont préalablement fait l'objet d'une étude systématique par reconstructions 3D dans le but de localiser les différents processus impliqués dans cette morphogenèse. La première molaire inférieure est également utilisée *in vitro*, pour étudier le rôle spécifique des constituants matriciels ou de diverses molécules actives tels que les facteurs de croissance et les différents événements que ces facteurs peuvent déclencher. La chronologie des différents processus impliqués dans l'odontogenèse est sensiblement respectée *in vitro* avec toutefois un retard aussi bien dans la morphogenèse que dans les cytodifférenciations.

### **I- Histogenèse épithéliale**

Il est admis que la transition bourgeon-capuchon est une étape critique au cours du développement dentaire, en particulier avec la mise en place du NEP. Dans la molaire, le NEP a été décrit comme une structure formée de cellules ayant un agencement concentrique, ne se divisant plus et présentant localement des apoptoses dans sa partie interne. L'intérêt porté à cette structure vient de ce que ses cellules expriment un grand nombre de molécules de signalisation. Le fait de perturber la signalisation de plusieurs molécules au cours de la transition bourgeon-capuchon conduit à un arrêt du développement au stade bourgeon dentaire (Jernvall et Thesleff, 2000). Le NEP est supposé jouer le rôle d'un centre de signalisation et induire la formation des NE secondaires aux sommets des cuspides de la molaire. Toutefois, on a montré le rôle critique du mésenchyme dentaire dans le contrôle du patron cuspidien (Schmitt et coll., 1999). De plus, l'hypothèse de l'induction de la formation des cuspides par diffusion de signal provenant du NEP ne permet pas d'expliquer l'apparition différée des cuspides antérieures et postérieures de la molaire inférieure. Enfin, le marquage par la BrdU et le suivi cinétique des cellules de l'épithélium dentaire interne, ont conduit à l'hypothèse selon laquelle, les cellules hors cycle ( $G_0$ ) du NEP pourraient se subdiviser en autant de sous-groupes que de cuspides vont se former (Coin et coll., 1999b). Dans le cas de la molaire, il existe une continuité entre les cellules BrdU négatives du NEP et les cellules BrdU négatives aux

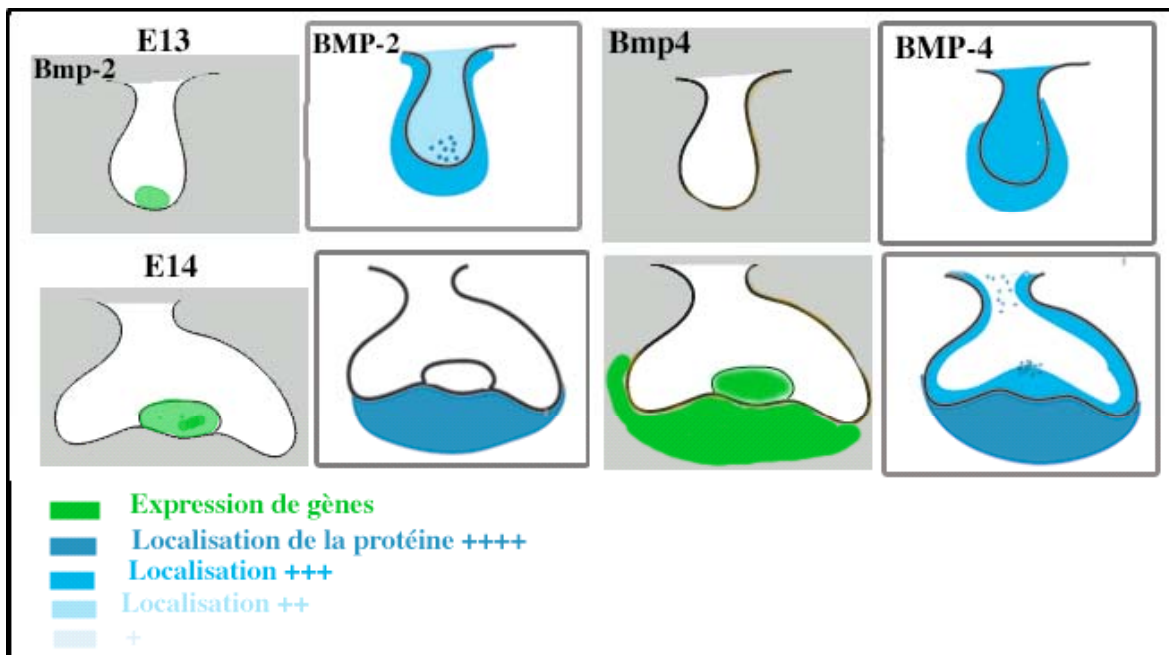


sommets des cuspidés formant les NES. Pour expliquer la redistribution des cellules BrdU négatives, on a supposé un rôle actif de quelques cellules en division observées dans le NEP (Coin et coll., 1999b). Dans le cas de l'incisive, dent à une seule cuspide, les cellules BrdU négatives du NEP ne subissent aucune ségrégation sans doute par le fait qu'aucune cellule en division n'a été observée dans cette structure (Kieffer et coll., 2000).

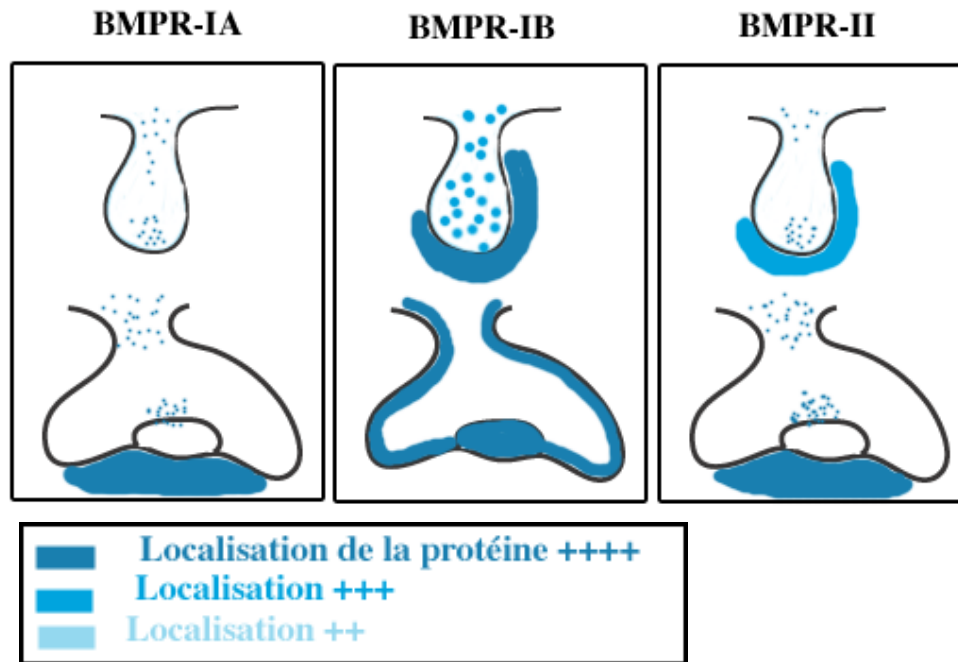
Dès le stade du bourgeon, on remarque l'expression intense de plusieurs gènes codant pour des molécules de signalisation (Bmp-2, Fgf-4 et Wnt10b) et facteurs de transcription (p21, Msx2 et Lef1) dans un sous-ensemble de cellules situées au sommet du bourgeon. Peu d'études ont porté sur la nature de ce centre de signalisation précoce et en particulier sur les mécanismes de sa formation même ou sur la réalité de sa relation avec le NEP. Pour compléter le travail réalisé par Coin et collaborateurs (1999b), nous avons étudié le devenir des cellules au sommet du bourgeon après culture en présence de BrdU et suivi des cellules BrdU négatives. Nos observations, en histologie et après reconstructions 3D, montrent la présence au stade bourgeon dentaire d'un ensemble de cellules hors cycle à l'origine des cellules du NEP. Il s'agit donc bien, au stade bourgeon, d'un précurseur du NEP. A ce stade, les protéines BMP-2 et BMP-4 sont présentes dans l'organe de l'émail avec une concentration plus importante de BMP-2 au niveau du sommet du bourgeon (Schéma 3). Ce marquage coïncide avec la présence du dimère BMPR-IA et BMPR-II, confirmant une signalisation au niveau de cette structure (Schéma 4). Au stade bourgeon dentaire, le complexe BMPR-IA/-II servirait de médiateur au signal de BMP-2 supposé induire la formation du NEP (Aberg et coll., 1997). Au même stade, BMP-4 et le dimère BMPR-IB/-II présentent un marquage plus important au niveau du mésenchyme en voie de condensation. L'asymétrie bucco-linguale dans la localisation de ces trois protéines a déjà été décrite pour le gène Bmp-4 (Aberg et coll., 1997). Alors qu'au niveau épithélial, BMP-2 agirait par le biais du dimère BMPR-IA/-II, dans le mésenchyme c'est exclusivement le complexe BMPR-IB/-II qui servirait de médiateur à l'action des BMPs principalement dans la condensation cellulaire.

Au stade de capuchon dentaire, aucun marquage spécial n'est détecté au niveau des cellules du NEP. BMP-2 et le dimère BMPR-IA/BMPR-II sont absents de l'organe de l'émail (Schémas 3, 4). Dans l'épithélium, WNT10b est présent au niveau de l'EDE et de l'EDI à l'exception des cellules du NEP (Schéma 5). A E14 seuls BMP-4 et le récepteur BMPR-IB sont présents dans l'organe de l'émail surtout au niveau de l'EDI. BMPR-IB n'est pas impliqué dans une stimulation de la prolifération cellulaire puisque nous l'avons détecté dans les cellules du NEP au contact de la MB, cellules qui ne se divisent pas (Lesot et coll., 1999). La signalisation par les BMPs passe par une activation des

Smads, particulièrement Smad1 et 5 alors que Smad2 et 3 sont activés par les TGF- $\beta$ s/Activine (Xu et coll., 2003). Selon ces auteurs, les protéines Smad1 et Smad5 sont fortement détectées dans l'EDI et le mésenchyme dentaire. Cette présence confirme le rôle supposé des BMPs dans les interactions épithélio-mésenchymateuses. De plus la forme phosphorylée de Smad1, forme active, a été détectée spécialement dans l'épithélium dentaire (Xu et coll., 2003). Cette observation renforce l'hypothèse d'une action locale des BMPs au niveau de l'organe de l'émail, ce qui nécessite la présence de récepteurs spécifiques. La transduction du signal par BMP-4 exige la dimérisation des récepteurs de type I et II pour une signalisation optimale, en plus BMP-4 ne se lie pas à ActR-II ou ActRI (Kim et coll., 2000). La présence uniquement de BMP-4 et BMPR-IB n'étant pas suffisante pour induire une fonction au niveau épithélial, il faut admettre que l'absence de BMPR-II dans l'organe de l'émail doit être compensée par un autre récepteur type II (Nadiri et coll., *soumis*).



**Schéma 3: Expression des gènes *Bmp-2* et *-4* et localisation des protéines correspondantes dans la M<sub>1</sub> à E13 et E14.**

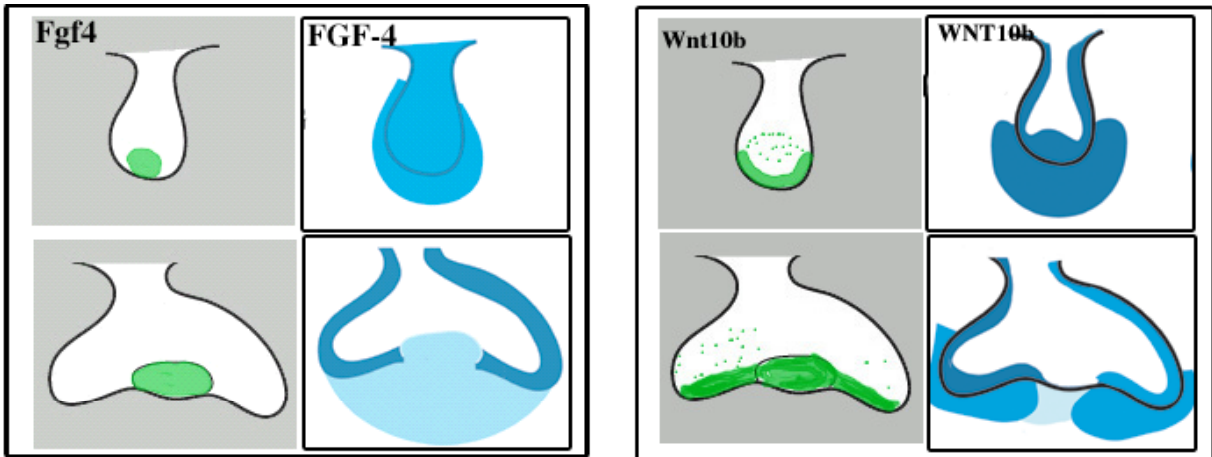


**Schéma 4 : Localisation de BMPR-I, BMPR-IB et BMPR-II dans la M<sub>1</sub> à E13 et E14**

Vainio et coll. (1991) ont suggéré que BMP-4 au niveau du mésenchyme à E14 pourrait intervenir dans la prolifération cellulaire. L'effet de BMP-4 au niveau du mésenchyme aurait pour médiateur le dimère BMPR-IA/-II (Schémas 3, 4). A l'inverse, au niveau de l'épithélium, il a été suggéré que BMP-4 serait impliquée dans l'induction d'un processus d'apoptose (Jernval et coll., 1998). A E15, BMP-4, BMPR-IA et BMPR-II montrent une colocalisation restreinte au niveau des cellules internes du NEP, cellules qui à ce stade sont éliminées par apoptose (Nadiri et coll., 2004, *soumis*). Cette observation est appuyée par le fait que les trois antigènes BMP-4, BMPR-IA et BMPR-II sont détectés au niveau du stalk, région montrant aussi une accumulation d'apoptoses (Viriot et coll., 1996). Cette différence dans l'événement déclenché pourrait être en fonction du type de la cascade stimulée et/ou pourrait aussi être dépendante de la dose en BMP-4 au niveau des deux tissus concernés.

La présence de FGF-4 à la jonction épithélio-mésenchymateuse au cours du développement dentaire est due à sa haute affinité pour les héparanes sulfates (HPSGs) (Schémas 5) (Aviezer et coll., 1999). Les HPSGs sont des constituants de la MB. Ils peuvent moduler la liaison de FGF-4 à ses récepteurs de haute affinité, FGFR-1 et FGFR-2 (Aviezer et coll., 1999 ; Allen et coll., 2001). La

présence de FGF-4 dans l'épithélium dentaire et celle de WNT10b dans les cellules épithéliales à l'exception du NEP suggèrent que ces deux protéines puissent être impliquées dans la stimulation de la prolifération cellulaire dans l'épithélium dentaire (Nadiri et coll., 2004). A E15, la présence de WNT10b dans l'organe de l'émail s'accroît au niveau de la lèvre cervicale. Ce marquage augmente encore au stade de cloche avec apparition d'un gradient de prolifération à E17.



**Schéma 5 : Expression des gènes *Fgf4* et *Wnt10b* et localisation des protéines correspondantes dans la  $M_1$  à E13 et E14.**

Tous les rôles suggérés ou attribués à ces facteurs de croissance se basent surtout sur l'étude des stades initiaux avant la formation du NEP. Il serait intéressant de compléter ces travaux par l'étude des rôles de ces molécules de signalisation à partir de stade capuchon, stade de la formation du centre de signalisation indispensable pour la cuspidogenèse, en prenant en compte le rôle de la MB au cours des interactions épithélio-mésenchymateuses par sa capacité à lier des facteurs nécessaires pour au développement dentaire. Ces travaux devront inclure l'analyse des effets doses qui semblent moduler voir changer les affinités des protéines à leur ligands spécifiques ainsi que la cascade d'événements induits.

## **II- Apoptose au cours du développement dentaire**

Dans la molaire, l'accumulation des apoptoses dans le NEP augmente du jour 14 au jour 15 (Lesot et coll., 1999).

L'apoptose a été localisée dans les dents en voie de développement depuis l'initiation de la morphogenèse jusqu'à la formation des cuspidés. L'apoptose est détectée dès le stade du bourgeon (E12-E13) dans les cellules épithéliales au centre du bourgeon (Vaahtokari et coll., 1996). Plus tardivement, l'apoptose s'observe dans d'autres populations cellulaires épithéliales y compris, les améloblastes, le SI et RS (Vaahtokari et coll., 1996). Des cellules apoptotiques, comme les ostéoclastes, ont aussi été localisées sur les surfaces de l'os alvéolaire en voie de développement.

La mort cellulaire programmée (PCD) joue un rôle important dans le développement embryonnaire. La mort d'une cellule est déclenchée par l'apparition ou la perte d'un signal externe (Schwartz et Osborne, 1993). Une forme de PCD est l'apoptose (Kerr et coll., 1972 ; Wyllie, 1987) et les traits morphologiques caractérisant ce processus incluent un clivage de l'ADN, une condensation nucléaire et cytoplasmique et une fragmentation des cellules en corps apoptotiques, et (Steller, 1995). Peu d'informations existent sur les mécanismes de contrôle moléculaire de l'apoptose au cours du développement dentaire, les études existantes se sont plus focalisées sur l'apoptose dans les améloblastes après la naissance (Joseph et coll., 1994).

Pour déterminer le rôle possible de l'apoptose dans le NEP au cours de la morphogenèse coronaire, des expériences d'inhibition des apoptoses ont été réalisées. Après action d'inhibiteurs des caspases, au stade capuchon, on observe une accumulation de cellules épithéliales formant une masse importante dans l'organe de l'émail. Dans la mesure où la morphogenèse coronaire de la molaire n'est pas affectée, il a été conclu que la mort cellulaire programmée du NEP permettait l'élimination de cellules ayant achevé leur rôle de signalisation (Coin et coll., 2000). Par contre, dans l'incisive, l'inhibition de l'apoptose ne conduit pas à l'accumulation de cellules épithéliales, sans doute du fait que, s'il en existe, très peu de cellules en apoptose sont initialement présentes dans le NEP (Kieffer et coll., 2000).

Il a par ailleurs été proposé que par défaut, toutes les cellules entraînent en apoptose à moins qu'elles soient secourues par certains facteurs (Raff, 1992 ; Steller, 1995). L'augmentation des concentrations de certains facteurs de croissance agissant par le biais de récepteurs à activité tyrosine kinase semble nécessaire à la survie cellulaire en supprimant les apoptoses (Collins et coll., 1994).

La mort cellulaire est un processus contrôlé par les BMPs, qui sont des molécules diffusibles. Cela pose donc une question de savoir pourquoi les zones apoptotiques sont restreintes dans le temps et l'espace? La présence au cours du développement dentaire d'inhibiteurs de BMPs, telle que la noggin peut limiter la distribution spatiale de la mort cellulaire comme cela a été observé dans le bourgeon du membre (Merino et coll., 1999). Il semble aussi que les FGFs pourraient intervenir dans ce processus (Montero et coll., 2001). Au cours du développement dentaire, on a toujours associé les FGFs à un rôle principal et même unique dans la prolifération des cellules épithéliales et mésenchymateuses (Vaahtokari et coll., 1996). Sur la base d'expériences réalisées à E13 sur des épithéliums et des mésenchymes isolés en culture, il a été montré que l'apoptose est très importante à la jonction épithélio-mésenchymateuse au niveau du mésenchyme et un apport exogène en EGF et FGF-4 diminue cette mort cellulaire (Vaahtokari et coll., 1996). En effet, l'apoptose est un phénomène normal détecté de façon permanente après la mise en culture de tissus, spécialement après dissociation des tissus dentaire et destruction de la MB, mais cette apoptose diminue en culture sans aucun apport en protéines exogènes. En effet la MB joue un rôle protecteur contre l'apoptose et cette MB est restauré rapidement dans le cas de réassociation tissulaires (Osman et Ruch., 1985). Le rôle de la MB dans la protection des cellules à son contact de l'apoptose peu être due en partie au stockage de certains facteurs de croissance telle que FGF-4, qui montre un fort marquage au niveau de la MB au cours des différents stades du développement dentaire plus spécialement au stade capuchon (E14-E15) (Nadiri et coll., 2004).

La signalisation des FGFs passe par l'intermédiaire de récepteurs à tyrosine kinase (FGFR1-3). FGFR-1 et FGFR-2, sont des récepteurs de haute affinité pour FGF-4 et FGF-10. Dans ce travail, nous avons montré que la localisation de FGFR-1 et FGFR-2 ne peut pas uniquement correspondre à un rôle des FGFs dans la prolifération cellulaire. En effet, on les trouve exprimés par des cellules qui ne se divisent pas et en plus sont bien présents dans des régions apoptotiques. Donc FGF-4 et FGF-10 ont d'autres rôles au cours du développement dentaire que la stimulation de la prolifération.

Notre étude montre que les FGFs sont nécessaires pour aussi bien la prolifération que pour l'apoptose. L'administration de FGF-4 pendant 12hrs est capable d'inhiber temporairement la mort cellulaire, mais au delà cet effet d'inhibition initial est suivi d'une augmentation remarquable de la fréquence des apoptoses. En absence des FGFs, les BMPs ne sont pas suffisants pour induire la mort cellulaire ce qui indique que l'établissement des régions apoptotiques exigent la présence des deux voies de signalisation. De plus, nous avons identifié Msx2 comme pouvant intervenir dans la signalisation de l'apoptose. L'expression de Msx2 nécessite la présence des deux voies de

signalisation FGF-4 et BMP-4. Notre étude montre donc l'existence d'une synergie entre les deux voies de signalisation dans le contrôle et la régulation de l'apoptose.

Ce travail devra être complété par l'étude de l'effet de la noggin, inhibiteur des BMPs, sur l'expression de FGF-4 et sur l'apoptose après différents temps de culture et l'étude aussi de l'effet combiné de ces deux molécules sur la prolifération et l'apoptose. De façon complémentaire, il conviendrait d'étudier les effets de Su5402, un inhibiteur des FGFs sur l'apoptose induite par un apport exogène de BMPs.

### **III- Le potentiel odontogène du mésenchyme**

Complétant les premières observations de Kollar et Baird. (1969), Schmitt et coll., (1999) ont réalisé des cultures de réassociations tissulaires hétérotopiques montrant que le NEP apparaît comme une structure modulable par le mésenchyme au stade capuchon. En effet, selon l'origine du mésenchyme utilisé dans les réassociations, provenant d'une molaire supérieure ou inférieure, la morphologie coronaire d'une première molaire inférieure peut être transformée en celui d'une première molaire supérieure et réciproquement, même lorsque le NEP est formé au moment de la dissociation/réassociation. De la même façon, l'absence de cellules en division dans le NEP de l'incisive pourrait donc être régulée par le mésenchyme, toutefois les facteurs impliqués dans ce mécanisme ne sont pas connus. Pour poursuivre ce travail, la question se posait de savoir si le mésenchyme pouvait être aussi impliqué dans le contrôle de l'histogénèse épithéliale. Ce travail a été abordé *in vitro* pour tester les effets du mésenchyme dentaire sur la réorganisation de cellules épithéliales dissociées. Ces approches fonctionnelles ont montré qu'effectivement le mésenchyme dentaire contrôlait l'histogénèse épithéliale (Hu et coll., 2005b). Cela ne semble pas nécessiter d'organisation spécifique du côté du mésenchyme puisque l'utilisation des cellules mésenchymateuses dissociées aboutit au même résultat (Hu et coll., 2005a).

Des réassociations entre un mésenchyme dentaire et des cellules épithéliales au stade de capuchon aboutissent à la formation d'une dent *in vitro*. Ces recombinaisons se font après une destruction complète de la MB et de la MEC associée cette MB (Lesot et coll., 1981 ; Osman et Ruch, 1981). Le mésenchyme peut ainsi contrôler l'histogénèse épithéliale après que toute l'organisation des cellules épithéliales ait été perdue par dissociation mais après une restauration de la MB. Après 3 jours de culture, l'histogénèse épithéliale se poursuit, au stade bourgeon, on était en présence d'uniquement deux populations cellulaires, avec la mise en place de l'EDI et l'EDE et aussi

l'apparition d'un ensemble de cellules dans l'EDI, semblable par son organisation au NEP *in vivo*. Dans les réassociations, ce groupe de cellules est BrdU négatif, exprime le gène Shh et présente une concentration des apoptoses dans ses cellules internes. La formation des cuspidés montre que ce NEP est fonctionnel.

La dissociation tissulaire et cellulaire altère les surfaces cellulaires, surtout les récepteurs membranaires et les molécules d'adhésion telles que les cadhérines (Tucker et coll., 2004) et les intégrines, deux systèmes importants dans la signalisation au cours du développement dentaire. La restauration de la jonction épithélio-mésenchymateuse précède tout signe d'histogénèse épithéliale dans les réassociations. Elle est formée après 12hrs de culture. Ces changements locaux dans la MB peuvent être impliqués dans une signalisation différentielle. La  $\beta$ -caténine est une molécule multifonctionnelle agissant en particulier au cours de la signalisation par Wnt et de l'adhésion cellule-cellule (Willert et Nusse, 1998 ; Hecht et Kemler, 2000 ; Obara et Lesot, 2004), elle peut être localisée à trois niveaux différents dans une cellule : en association avec la membrane plasmique, dans le cytoplasme, ou dans le noyau. Les fonctions différentes de cette molécule en particulier au niveau cellulaire et/ou tissulaire sont en rapport avec sa localisation subcellulaire et son degré de phosphorylation (van Noort et coll., 2002). La  $\beta$ -caténine est importante pour les interactions cellule-cellule par l'intermédiaire des cadhérines (Ozawa et coll., 1989). Cette protéine est ainsi essentiellement impliquée dans les jonctions adhérentes. La voie Wnt/ $\beta$ -caténine intervient dans le contrôle de la prolifération et de la survie cellulaire. Des études d'immunolocalisation ont montré que la  $\beta$ -caténine est exprimée partout dans l'épithélium dentaire à l'exception d'une étape tardive d'amélogénèse (Fausser et coll., 1998 ; Sorkin et coll., 2000). La  $\beta$ -caténine montre une accumulation importante dans l'épithélium au stade de bourgeon tardif (van Noort et coll., 2002). La localisation subcellulaire de la  $\beta$ -caténine reflète probablement des effets différents de cette molécule au cours du développement dentaire. Au stade du capuchon dentaire, la  $\beta$ -caténine est présente dans l'organe de l'émail, quand les cellules de l'épithélium se différencient en plusieurs compartiments avec des morphologies et des destinées différentes (Lesot et coll., 2002). De plus, à E14, la  $\beta$ -caténine montre une localisation nucléaire préférentielle dans les cellules du NEP, au lieu d'une localisation cytoplasmique dans les cellules de l'épithélium dentaire interne. Cette localisation nucléaire coïncide avec une forte présence de P-cadhérine (Obara et Lesot, 2004). Dans les recombinaisons, la  $\beta$ -caténine est présente aussi bien au niveau de l'EDI et l'EDE que dans les cellules du NEP, ce marquage co-localise uniquement avec WNT5a et le récepteur Fz. Il a été proposé que la  $\beta$ -caténine dans les cellules du NEP régulerait l'expression des Wnts (Behrens et coll., 1996). Le gène Wnt5a



n'est pas exprimé au niveau épithélial et la protéine correspondante n'intervient pas dans la voie canonique stimulant la  $\beta$ -caténine donc la présence de WNT5a au niveau des cellules du NEP ne stimule pas la  $\beta$ -caténine et donc n'intervient pas dans la régulation de l'expression des gènes Wnts au niveau de cette structure.

Plusieurs membres de la famille des Wnts interviennent au cours du développement dentaire. Il a été montré que Wnt7b pourrait jouer un rôle dans le maintien des limites entre les cellules de l'ectoderme oral et cellules de l'épithélium dentaire (Sarkar et coll., 2000). Une autre molécule de signalisation de la famille des TNFs- $\alpha$ , l'ectodysplasine (EDA), a été identifiée comme une cible de Lef-1. L'expression de Eda est inhibée chez les souris Lef1<sup>-/-</sup>, mais peut être restaurée par un apport exogène de WNT6 d'une manière LEF1-dépendante (Laurikkala et coll., 2002). Wnt10b induit aussi l'expression du gène Lef-1 aussi bien dans l'épithélium que dans le mésenchyme dentaire (Dassule et McMahon, 1998 ; Genderen et coll., 1994 ; Kratochwil et coll., 1996). Le rôle de Lef-1 pendant l'odontogenèse dépend de son interaction avec la  $\beta$ -caténine (Kratochwil et coll., 2002) car Lef-1 peut agir comme un effecteur du complexe Wnt/ $\beta$ -caténine. Une cible directe de Lef-1 dans la dent est le gène Fgf-4 qui est exprimé exclusivement dans le NEP et ensuite dans les NES (Vaahtokari et coll., 1999). La seule fonction proposée pour Lef1 dans le développement dentaire était de produire un signal passant de l'épithélium vers le mésenchyme pour stimuler le gène Fgf3 (Kratochwil et coll., 1996). Cette signalisation fait intervenir FGF-4, une protéine un signal épithélial Lef1-dépendant nécessaire pour la progression du développement dentaire dans la transition bourgeon-capuchon. Dans la molaire inférieure WNT10b et FGF-4 sont localisés spécifiquement dans l'EDI et le mésenchyme dentaire et plus précisément au contact de la MB. Par contre au niveau des réassociations, le marquage épithélial est complètement perdu, ces résultats suggèrent une relation fonctionnelle directe entre WNT10b et FGF-4 et la question se pose dans le cas des réassociations de savoir pourquoi ces deux protéines sont absentes de l'épithélium dentaire. Sachant que les deux gènes codant pour WNT10b et FGF-4 sont exprimés exclusivement au niveau du NEP, il semble que le NEP nouvellement formé dans les réassociations n'exprime pas tous ses marqueurs spécifiques, sans pour autant que cela n'ait de conséquences sur l'histogenèse épithéliale à venir, ni sur les cytodifférenciations. Ces résultats suggèrent que les deux gènes n'auraient pas de rôle primordial dans ces processus ou qu'ils peuvent être compensés par d'autres membres des deux familles.

Toutes ces données confirment le rôle du mésenchyme au stade capuchon dans l'organisation et le contrôle de l'histogenèse épithéliale et illustre le rôle du mésenchyme dans la restauration d'un organe de l'émail avec la mise en place des différents compartiments épithéliaux. Ce système, met en

évidence l'existence d'une importante plasticité cellulaire dans la mesure où la position des cellules dans les réassociations, forcément différente de leur positions initiales avant dissociation, n'empêche ni la restauration de l'histogénèse épithéliale ni le développement d'une morphogénèse coronaire (Hu et coll., 2005b). Mais la question demeure de savoir si l'absence de WNT10b et FGF-4 observée dans les réassociations résulte d'un dysfonctionnement au niveau des gènes concernés ou si les protéines exprimées dans les réassociations peuvent avoir diffusées dans le milieu de culture. Une analyse par hybridation *in situ* pour Fgf-4 et Wnt10b et celle des composants de la MEC dans les recombinaisons permettant d'étudier de phénomène.

#### **IV. Rôles différents de BMP-2 et -4 selon le stade considéré**

Au début de la phase de cytodifférenciation, les premiers odontoblastes se différencient au sommet des cuspidales principales et leur différenciation progresse vers la partie basale de la cuspidale, avec un patron bien spécifié selon la molaire considérée (Lisi et coll., 2003). La différenciation terminale des améloblastes suit 24hrs plus tard. Bmp-2 est exprimé par les odontoblastes et les préaméloblastes, quand la sécrétion de la prédentine démarre (Begue-Kirn et coll., 1994 ; Aberg et coll., 1997). De la même façon, Bmp-4 est exprimé par les odontoblastes (Begue-Kirn et coll., 1994) où il persiste plus longtemps que Bmp-2 (Aberg et coll., 1997). Des approches expérimentales *in vitro* (Begue-Kirn et coll., 1992 ; Ruch, 1998 ; Unda et coll., 2000) et nos immunolocalisations (Nadiri et coll., 2004) montrent que BMP-2 et -4 sont présentes au pôle apical des odontoblastes suggérant que les effets de ces deux BMPs actives *in vitro* peuvent avoir un rôle physiologique.

La dégradation de la MB par les MMPs (Sahlberg et coll., 1992) permet l'établissement de contacts directs entre les préaméloblastes et la matrice prédentine-dentine. De nombreuses expériences ont montré la nécessité de la présence de cette matrice dans le contrôle de la différenciation terminale des améloblastes. Cependant, il a été montré que certains facteurs de croissance membres de la famille des TGF- $\beta$ s, tels que TGF $\beta$ -1 et BMP-2 (Begue-Kirn et coll., 1994), présents dans cette matrice, sont susceptibles de promouvoir la polarisation cytologique des améloblastes à E19. A ce stade, BMPR-IB et BMPR-II sont détectés au pôle apical des odontoblastes et au pôle basal des améloblastes, ce qui en accord avec la fonction attribuée à BMP-2 et BMP-4 dans l'induction de la différenciation des deux types cellulaires. Cependant, les odontoblastes peuvent ne pas être la seule source de BMPs. Bien que l'hybridation *in situ* ait montré que les odontoblastes expriment Bmp-2 plus fortement et plus longtemps que les cellules du SI (Begue-Kirn et coll., 1994), la protéine BMP-2 et le complexe BMPR-IA/-II donnent un fort marquage dans le SI ce qui indique

que cette couche cellulaire est aussi susceptible de répondre aux BMPs. Bien que le rôle exact du SI ne soit pas encore clair, il pourrait être impliqué initialement dans la réorganisation de l'EDI, et plus tard dans la cytodifférenciation des améloblastes. Il a été montré que Shh est fortement exprimé dans le SI avant qu'il ne puisse être détecté dans l'EDI (Koyama et coll., 2001). Par ailleurs, BMP-2 peut agir en aval du gène Shh (Drossopoulou et coll., 2000 ; Loi LY et coll., 2002) en inhibant l'effet de Shh sur la prolifération cellulaire (Rios et coll., 2004). Toutes ces données suggèrent un rôle du SI pouvant faire intervenir les BMPs, dans la différenciation des améloblastes.

Ainsi le développement dentaire implique une succession d'événements cellulaires qui peuvent être stimulés par BMP-2, -4, FGF-4 et WNT10b: la prolifération cellulaire et l'apoptose aux premiers stades, la différenciation cellulaire beaucoup plus tardivement. Ces changements de fonction se traduisent par différentes localisations et aussi par des changements dans les concentrations en protéines en fonction des stades. Ainsi différentes activités cellulaires peuvent être induites par des BMPs, de façon dose-dépendante. Alors que la prolifération cellulaire est stimulée par de faibles doses de BMPs, et cela par le biais de Pax3, à plus fortes doses, les BMPs induisent la répression de Pax3 et la différenciation terminale de cellules (Amthor et coll., 1998, 1999). Les variations dans les concentrations de BMP-2 et -4 et les changements dans le patron d'expression de leurs récepteurs donnent une idée de la façon dont BMP-2 et BMP-4 peuvent stimuler des activités cellulaires différentes.

# **ANNEXE**

[Signalement bibliographique ajouté par : ULP SCD – Service des thèses électroniques]

**Dental epithelial histo-morphogenesis in the mouse: positional information versus cell history**

Bing Hu, Amal Nadiri, Sabine Bopp-Kuchler, Fabienne Perrin-Schmitt, Songlin Wang and Hervé Lesot

**Archives of Oral Biology, 2005, Volume 50, N° 2 , Pages 131-136**

Pages 131-136 :

La publication présentée ici dans la thèse est soumise à des droits détenus par un éditeur commercial.

Pour les utilisateurs ULP, il est possible de consulter la publication sur le site de l'éditeur :

<http://dx.doi.org/10.1016/j.archoralbio.2004.09.007>

Il est également possible de consulter la thèse sous sa forme papier ou d'en faire une demande via le service de prêt entre bibliothèques (PEB), auprès du Service Commun de Documentation de l'ULP, [peb.sciences@scd-ulp.u-strasbg.fr](mailto:peb.sciences@scd-ulp.u-strasbg.fr)