

**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***

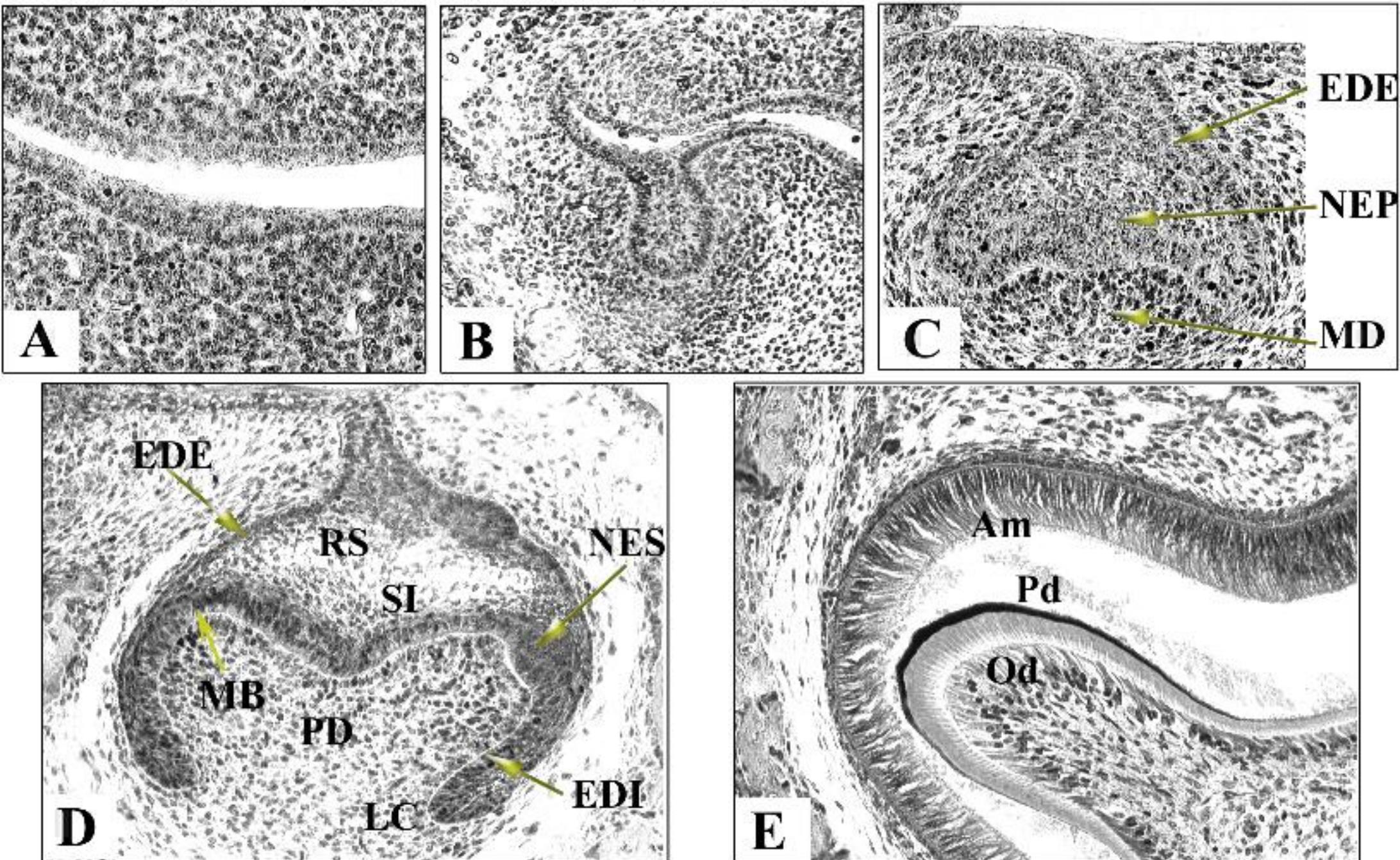
La première manifestation morphologique du développement dentaire apparaît au 11<sup>ème</sup> jour du développement embryonnaire (E11) et consiste en un épaissement de l'épithélium buccal formant la lame dentaire (Fig. 1A). Le développement de la lame ne semble pas résulter d'activités mitotiques différentielles 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).



**Figure 1: Coupes histologiques frontales à différents stades du développement dentaire,**

A- lame ; B-bourgeon; C- capuchon; D-cloche; E- cytodifférenciation.

Am: améloblastes; EDE: épithélium dentaire externe; EDI: épithélium dentaire interne; LC: lèvres cervicales; MB: membrane basale; MD: mésenchyme dentaire; NEP: noeud de l'émail primaire; NES: noeud de l'émail secondaire; Od: odontoblastes; Pd : prédentine; PD: pulpe dentaire; RS: réticulum stellaire; SI: stratum intermedium.

#### **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.

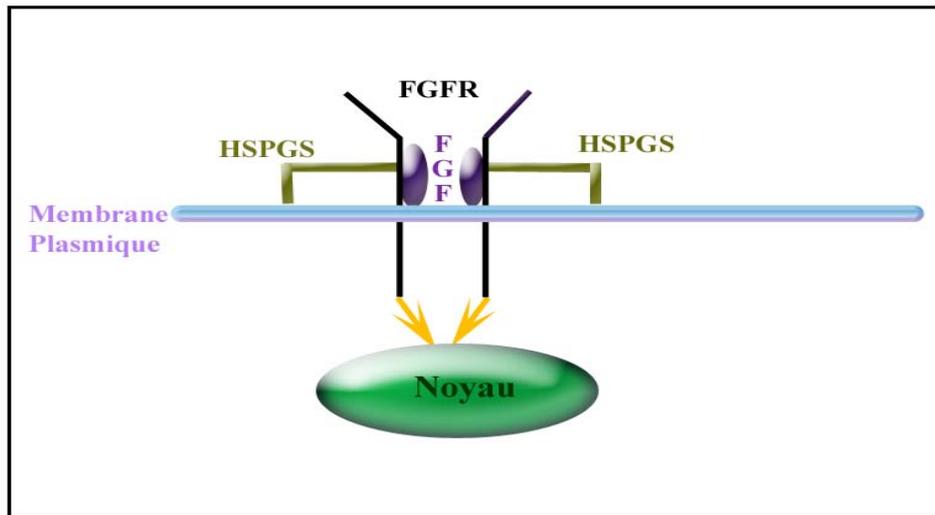
##### **I.4.1 Les odontoblastes**

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**



**Figure 2: Mécanisme de signalisation réglé par les FGFs.**

Les FGFs se lient aux récepteurs FGFR et induisent leur dimérisation.

Des protéoglycanes à Heparane sulfate (HSPGs) interviennent activement dans le mécanisme extracellulaire.

| FGFs  | Lame | Bourgeon | Capuchon | Cloche | Diff |
|-------|------|----------|----------|--------|------|
| Fgf1  | -    | +        | +        | +      | +    |
| Fgf2  | -    | +        | +        | -      | +    |
| Fgf3  | -    | +        | +        | +      |      |
| Fgf4  |      | +        | +        | +      | +    |
| Fgf7  | -    | -        |          |        | +    |
| Fgf8  | +    | +        | -        | -      | -    |
| Fgf9  | +    | +        | +        | +      | -    |
| Fgf10 | -    | +        | +        | +      | +    |

**Tableau 1 : Expression des Fgfs au cours du développement dentaire.** +, expression ; -, pas d'expression.

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

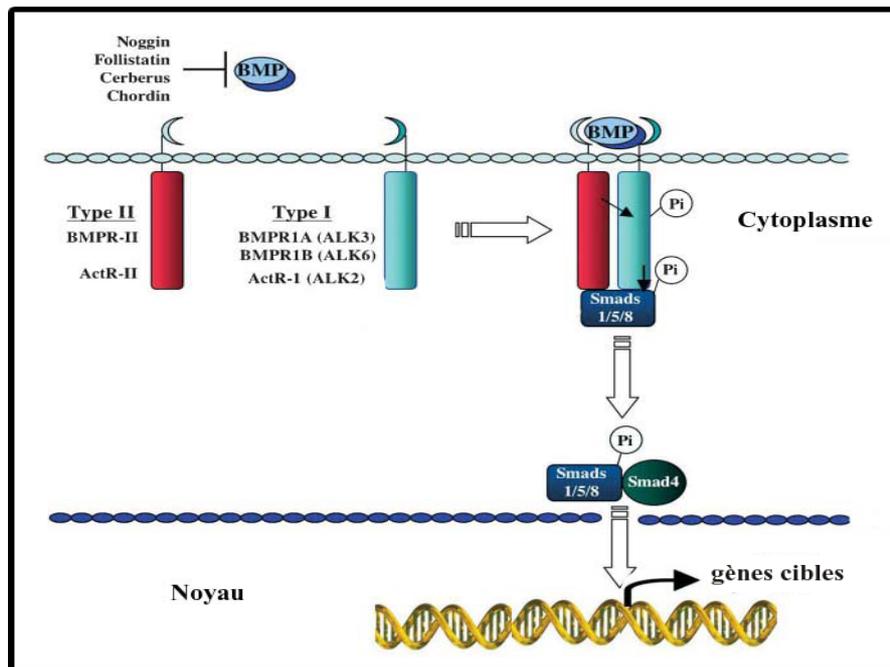
Chez les vertébrés, la famille des FGFs (Fibroblast Growth factors) comporte au moins 24 membres et quatre récepteurs de haute affinité (FGFRs). Les FGFs possèdent une séquence (core) conservée d'environ 120 acides aminés qui leur confèrent la capacité de se lier à l'héparine ou aux protéoglycanes de 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-



**Figure 3: Cascade de signalisation des BMPs.**

BMP 2, 4 et 7 se lient aux récepteurs de type I et type II. L'hétérodimère formé est phosphorylé. Cela mène à la phosphorylation et à l'activation du récepteur (R-) Smads (1, 5 ou 8). Les R-Smads réagissent réciproquement avec co-Smad (Smad 4). Cette réaction permet la translocation du complexe au noyau, afin de réagir avec les autres facteurs de transcription tel que Runx1. Une alternative à la voie de Smad (Smad-Indépendant) (par exemple, p38 MAPK) n'est pas montré.

| BMPs | Lame | Bourgeon | Capuchon | Cloche | Diff |
|------|------|----------|----------|--------|------|
| Bmp2 | +    | +        | +        | +      | +    |
| Bmp3 | -    | -        | +        | +      | +    |
| Bmp4 | +    | +        | +        | +      | +    |
| Bmp5 | -    | -        | -        | -      | +    |
| Bmp6 | -    | +        | +        | -      | -    |
| Bmp7 | +    | +        | +        | +      | -    |

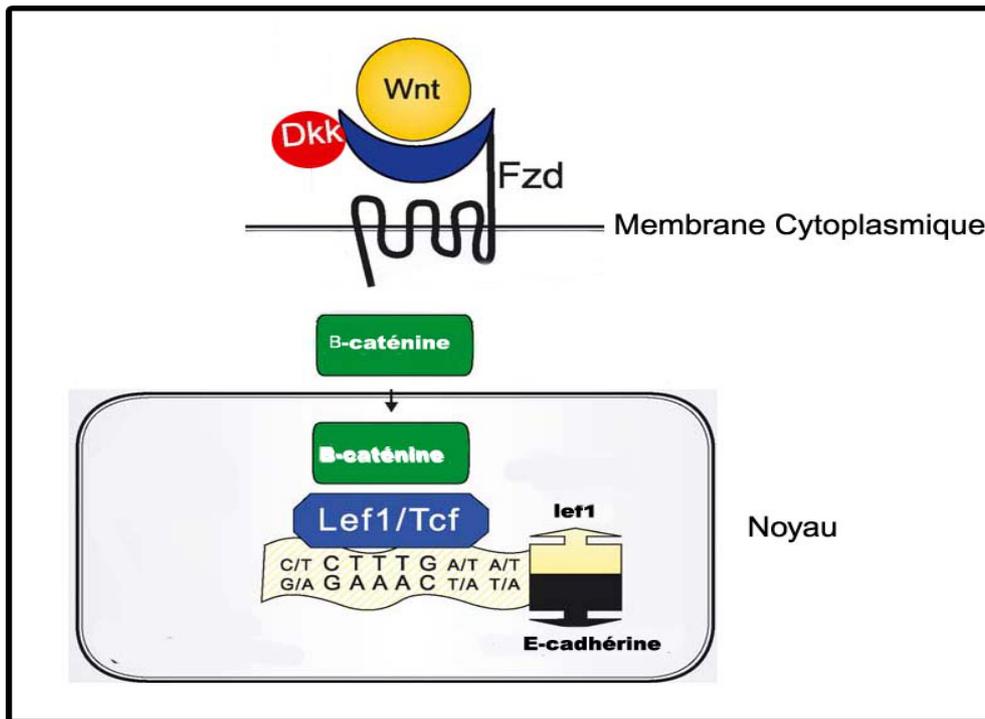
**Tableau 2 : Expression des Bmps aux cours des différents stades du développement dentaire.** +, expression, -, pas d'expression.

$\beta$ 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



**Figure 4: Schéma illustrant la voie de signalisation Wnt/ $\beta$ -caténine.**  
 La voie canonique est responsable de l'activation du facteur de transcription Lef1 capable de stimuler FGF4 au cours du développement dentaire.

| Wnts   | Lame | Bourgeon | Capuchon | Cloche | Diff |
|--------|------|----------|----------|--------|------|
| Wnt3   | +    | -        | -        | +      | +    |
| Wnt4   | +    | +        | +        | +      |      |
| Wnt5a  | +    | +        | +        | +      |      |
| Wnt6   | +    | +        | +        | +      |      |
| Wnt7b  | +    | +        | +        | +      |      |
| Wnt10a | +    | +        | +        |        |      |
| Wnt10b | +    | +        | +        | +      |      |

**Tableau 3 : Expression des Wnts au cours de l'odontogenèse.**  
 +, expression ; -, pas d'expression.

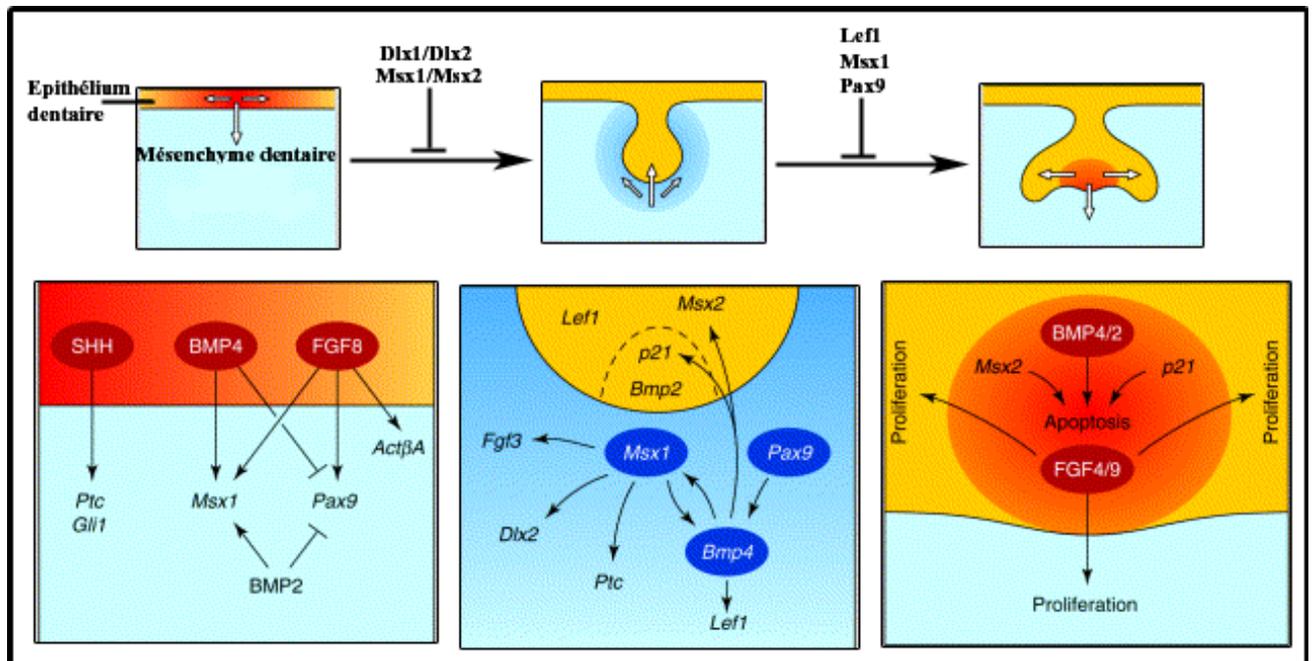
sécrétée sous forme de précurseur puis clivée en une partie N-terminale et une partie C-terminale. Seule la partie N-terminale de SHH est capable d'interagir avec un complexe transmembranaire formé de deux protéines : Patched (Ptc1) et smoothened (Smo) et permet ainsi la transduction du signal dans la 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



**Figure 5 Représentation schématique des signaux et facteurs de transcription impliqués dans la régulation des différents stades du développement dentaire.** L'épithélium est représenté en jaune et le mésenchyme en bleu. Certaines mutations (*Msx1* et *2*<sup>-/-</sup> ; *Dlx1* et *2*<sup>-/-</sup>) stoppent le développement dentaire au stade de lame dentaire et d'autres (*Pax9*<sup>-/-</sup> ; *Msx1*<sup>-/-</sup> ; *lef1*<sup>-/-</sup>) bloquent la transition bourgeon-capuchon. (Schéma modifié de Peters et coll., 1998).

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> (Kratowil 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* (Kratowil 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 morphogenèse 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 cuspides. 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 cuspidogenèse, en autant de sous-ensembles que de cuspides 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 cuspides. 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 cuspides. 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 cuspides, 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***

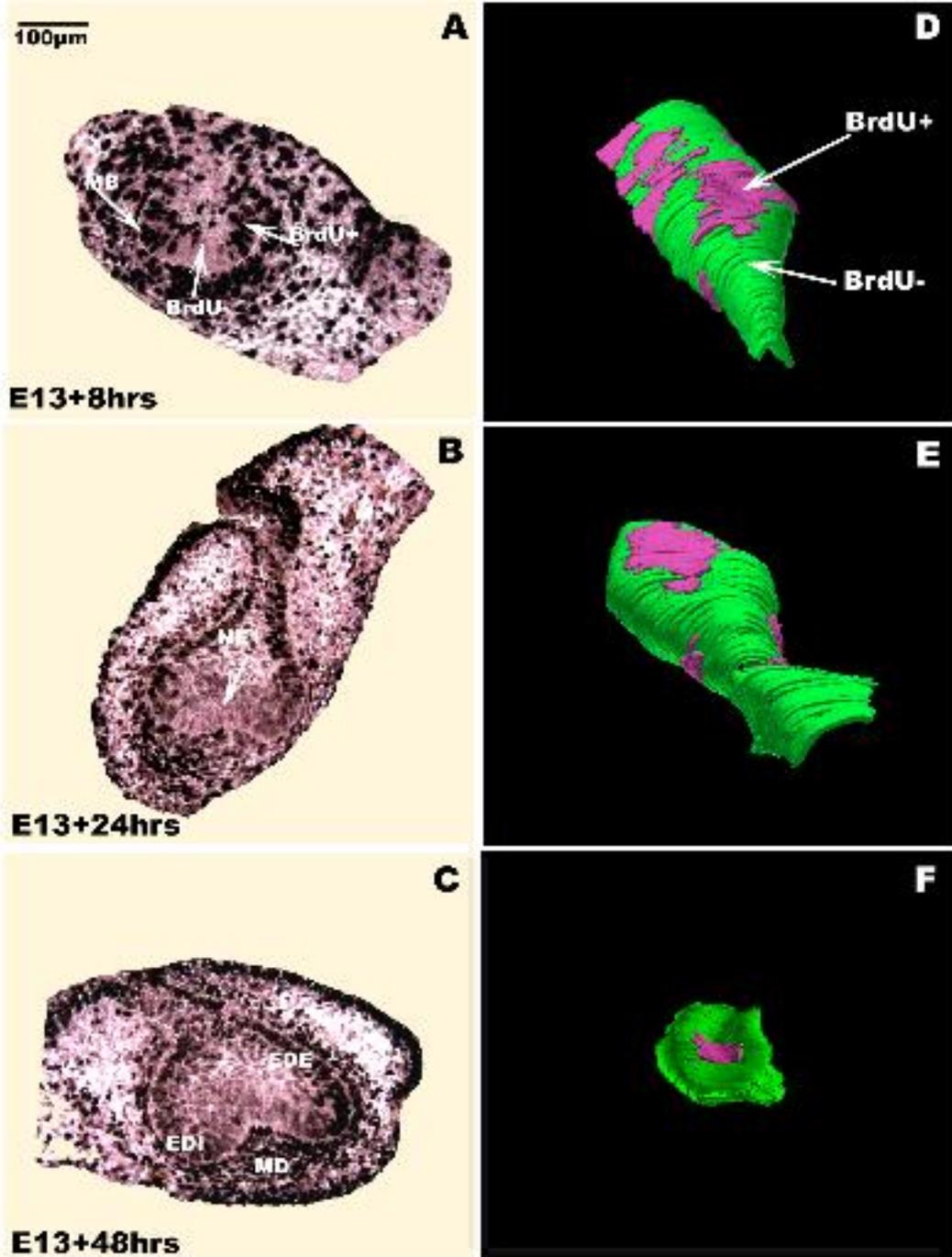
Ces travaux nous ont permis de comparer l'immunolocalisation de BMP-2, BMP-4, FGF-4 et WNT10b aux données existantes sur l'expression des gènes correspondants au cours du développement de la première molaire inférieure chez la souris. BMP-2 est présente principalement dans le mésenchyme du stade bourgeon 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 cuspides 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<sub>0</sub> 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 290µm (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 240µm (Figs. 6B, E). Pour un marquage long de 48hrs, on observe une régression remarquable de la zone BrdU- qui passe à 110µm 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



**Figure 6 : Coupes histologiques et reconstructions en 3D de la 1ère molaire cultivée in vitro en présence de BrdU pendant 8hrs (A, D); pendant 24hrs (B, E) et pendant 48hrs (C, F).**

BrdU-: zone BrdU négative; BrdU+: zone BrdU positive;  
 EDE: épithélium dentaire externe; EDI: épithélium dentaire interne; MD: mésenchyme dentaire; NE1: noeud de l'émail primaire.

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.

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

Immunolocalization of BMP-2/-4, FGF-4, and WNT10b in the Developing Mouse First Lower Molar

**A. Nadiri**, S. Kuchler–Bopp, Y. Haikel and H. Lesot

**Journal of Histochemistry and Cytochemistry, 2004, Volume 52 (1), Pages 103-112**

Pages 103-112

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 cette publication sur le site de l'éditeur :

<http://www.jhc.org/cgi/content/full/52/1/103>

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)

## 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.



Draft Manuscript for Review

**Expression patterns of BMPRs in the developing mouse molar**

|                               |   |
|-------------------------------|---|
| Journal:                      | <i>Histochemistry and Cell Biology</i>  |
| Manuscript ID:                | HCB-0012-05-Drenckhahn  |
| Manuscript Type:              | Original manuscripts  |
| Date Submitted by the Author: | 14-Jan-2005   |
| Complete List of Authors:     | Nadiri, Amal; Institut de Biologie Médicale, INSERMU595<br>Kuchler-Bopp, Sabine; Institut de Biologie Médicale, INSERMU595<br>Perrin-schmitt, Fabienne; Faculté de Médecine, 2) LGME, CNRS-ULP<br>UMR 7104<br>Lesot, Hervé; ; Institut de Biologie Médicale, INSERMU595 |
| Keywords:                     | tooth development, BMP receptors, morphogenesis, cell differentiation, apoptosis  |
|                               |   |

## Expression patterns of BMPRs in the developing mouse molar

Nadiri A.<sup>1</sup>\*, Kuchler-Bopp S.<sup>1</sup>, Perrin-Schmitt F.<sup>2</sup>,  
and Lesot H.<sup>1</sup>

1) INSERM-ULP UMR 595, Institut de Biologie Médicale, Faculté de Médecine,  
Strasbourg, France

2) LGME, CNRS-ULP UMR 7104, Faculté de Médecine, Strasbourg, France.

\* **Corresponding author:** A. Nadiri,  
UMR-U595, Institut de Biologie Médicale,  
Faculté de Médecine,  
11, rue Humann,  
67085 Strasbourg cedex  
Tel: 03.90.24.31.08  
Fax: 03.90.24.35.64  
E-mail: Amal.Nadiri@odonto-ulp.u-strasbg.fr

**Abstract**

Bone morphogenetic proteins (BMPs) have been shown to influence cell growth, differentiation and apoptosis during tooth development. To identify the responding cells and better understand BMP signaling, we analyzed the distribution patterns of the BMP receptors BMPR-IA, BMPR-IB and BMPR-II from the bud to the cap stage. At the bud stage, BMPR-IA/II would mediate the effects of BMP-2 in the dental epithelium while in the mesenchyme, BMPR-IB/II were detected in the mesenchyme and could mediate the effects of BMP-4 in stimulating cell condensation and proliferation. At the cap stage, BMPR-IB was detected in the epithelium but not BMPR-II, suggesting the existence of another type II receptor to form a functional dimer. At the late cap stage, BMPR-IA and -II showed a heterogeneous distribution in the mesenchyme, similar to that of BMP-4. The three molecules concentrated in the regions where cusps will start to form 24 hours later. In the epithelium, BMP-4, BMPR-IA and -II were restricted to the internal part of the PEK and to the stalk, two areas where apoptosis accumulates. At the late bell stage, BMPR-IB/II might mediate the signaling of BMP-2 or -4, known to be able to induce odontoblast differentiation, while BMPR-IA/II would play the same role during ameloblast differentiation. These results provide the first evidence of multiple type I and type II receptors for BMPs, expressed in the dental epithelium and mesenchyme at different stages of tooth development, to mediate the signaling of different cellular activities in a time- and tissue-specific way.

**Key words:** tooth development, BMP receptors, morphogenesis, cell differentiation, apoptosis.

## INTRODUCTION

The developing mouse molar is a current model to study the regulation of organogenesis. Specific epithelial-mesenchymal interactions control odontogenesis, which comprises tooth initiation, morphogenesis, epithelial histogenesis and cytodifferentiation. These interactions are regulated by several conserved signaling molecules: BMPs, FGFs, Hh and Wnts.

Bone morphogenetic proteins (BMPs) represent the largest subgroup within the TGF- $\beta$  superfamily. They have diverse and sometimes paradoxical effects during embryonic development (Panchision et al. 2001). They may induce or stimulate different cellular activities such as cell proliferation, differentiation, and/or apoptosis (Onishi et al. 1998; Wordinger et al. 2002). BMPs transduce their signals by binding to different type I and type II serine/threonine kinase membrane receptors and inducing their dimerization. Three type I receptors (BMPR-IA, -IB and ActR-I), and two type II receptors (BMPR-II and ActR-II) have been identified. BMPR-II on its own binds BMP-2, -4 and BMP-7, but this binding is enhanced by type I BMP receptors, including BMPR-IA, BMPR-IB as well as ActR-I, which is primarily a type I receptor for activin (Liu et al. 1995). Although both type I and type II receptors have kinase activity, essential for signaling, BMPR-II cannot transduce a signal if not dimerized with BMPR-I. BMPR-II is thus the primary receptor while the type I receptor acts as a signaling element (von Bubnoff and Cho 2001). Depending on the ligand, BMPR-II differs in its ability to interact with three mammalian type I receptors, and the resulting dimers differ in the events they signal (Liu et al. 1995). In several different models (neural precursor cell, osteoblasts or chondrocytes), it has been shown that the effects of BMPs on cell proliferation are mediated by BMPR-IA, while their stimulation of cell differentiation is mediated by BMPR-IB (Onishi et al. 1998; Panchision et al. 2001). Furthermore, the activation of these receptors can be inter-related (von Bubnoff and Cho 2001). Secreted molecules, such as noggin, chordin, follistatin, or gremlin, are able to sequester and antagonize or modulate BMP signaling.

Although a considerable amount of data exists on the expression and functions of BMPs during tooth development, the expression of BMP receptors in teeth has not been extensively studied. Only data for BMPR-IA have been published (Dewulf et al. 1995; Andl et al. 2004). Furthermore, the target cells for BMP signaling during tooth development have not been identified. To better understand where and which receptors are implicated in BMP signal transduction, we have investigated the distribution patterns of BMPR-IA, BMPR-IB and BMPR-II during tooth development. This study was performed on the first lower molar in the mouse, from the bud to the late bell stage.

## MATERIAL AND METHODS

### Immunohistochemistry

ICR female mice were mated overnight, and the detection of a vaginal plug was considered as Embryonic day 0 (E0). The embryos were harvested at E13, 14, 15, 17 or 19, and the heads were frozen in 2-methyl butane in dry ice. Frontal and serial (7  $\mu$ m) frozen sections were rehydrated for 10 min in phosphate buffered saline (PBS). Immunohistochemical detection was performed as previously described (Nadiri et al. 2004). Briefly, the tissue sections were treated with 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> to inhibit endogenous peroxidase, and non-specific binding was blocked with 10% normal goat serum. Immunostaining with goat primary antibodies directed against BMPR-IA (1/50), BMPR-IB (1/500) and BMPR-II (1/100) (Santa Cruz, CA) was performed overnight at 4°C. After several washes in PBS, the sections were incubated in biotinylated anti-goat IgG (1/250) (Santa Cruz, CA) for 30 min at room temperature. Following incubation with streptavidin-peroxidase complexes (Vector Laboratories) for 30 min, the sections were rinsed with PBS and the immune reactions were developed by incubation with DAB chromogen (Vector Laboratories). For controls, normal goat serum was used instead of the primary antibodies. All sections were counterstained with Mayer's hematoxylin.

### Tissue Preparation

For RT-PCR and Western blotting, the dental epithelium and mesenchyme were dissociated from E14 first lower molars, by using 1% trypsin in Hanks at 4°C for 30 min (Schmitt et al. 1999). The reaction was stopped by using 20% fetal bovine serum (CAMBREX) for 10 min.

### RT-PCR

Total RNA was extracted from the first lower molars, dissociated dental and oral epitheliums and mesenchyme at E14, using the RNeasy kit (Qiagen). First strand cDNA synthesis was obtained using random hexamers (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. This cDNA was then used as a substrate for PCR amplification for 40 cycles. We used the following PCR primer pairs: 5'-CTCATGTTCAAGGGCAG-3' and 5'-CCCCTGCTTGAGATACTA-3' (53.2°C) for BMPR-IA; 5'-ATGTGGGCACCAAGAAG-3' and 5'-CTGCTCCACCCAATGCT-3' (50.9°C) for BMPR-IB; 5'-GTGCCCTGGCTGCTATGG-3' and 5'-TGCCGCCTCCATCATGTT-3' (54.4°C) for BMPR-II and 5'-TTGTTGGAATTTGAAATTCCAGACAAG-3' and 5'-GCATTTAAAAGGAACTGTTGACAAG-3' (52°C) for HPRT. HPRT was used for standarization in all RT-PCR experiments. Controls were performed in the absence of reverse transcriptase.

### Western Blotting

1  
2  
3 First lower molars (E14, 15, 17 and 19), dissociated dental epitheliums and mesenchymes  
4 (E14) were homogenized in a lysis buffer as previously described (Kwon et al. 1997) to analyze  
5 BMPR-IA and BMPR-IB and according to (Kim et al. 2000) to analyze BMPR-II. The protein  
6 concentration was determined by the Bradford method. Proteins (20  $\mu$ g of each sample) were  
7 separated by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (12% acrylamide) under reducing conditions  
8 and transferred to nitrocellulose for 3h at 36V. Blots were saturated with 1% BSA in Tris buffered  
9 saline (TBS) pH 7.4 containing 0.1% Tween 20 (TBST). Primary antibodies were diluted in TBS  
10 with 0.1% Tween 20. The blots were incubated with BMPR-IA, BMPR-IB and BMPR-II  
11 antibodies (Santa Cruz, CA) (1/500), overnight at 4°C. Then, the blots were washed twice with  
12 TBST and incubated with horseradish peroxidase (HRP) -conjugated anti-goat IgG (Sigma,  
13 1/40000) for 1h at room temperature. Enhanced chemiluminescence was performed with the ECL  
14 western blot detection kit (Amersham Biosciences, UK) according to the instructions of the  
15 manufacturer, and the blots were exposed to Hyperfilm (Amersham) for 30s to 1 min. The molars  
16 at E13 could not be assessed because of significant contamination by the peridental mesenchyme.

17  
18 For antigen quantitation of BMPR-IA, BMPR-IB and BMPR-II during molar development,  
19 nitrocellulose membranes were then treated as previously described (Nadiri et al. 2004). All  
20 protein bands were scanned, and the density of each band was determined using NIH Image 1.63  
21 software (NIH Bethesda, MD). MAPK was used as a control.

### 22 **Statistical analysis**

23  
24 The data, expressed as means $\pm$ SD, were normalized against MAPK by calculating the  
25 protein/MAPK density ratio. For each stage, the quantitation of BMPR-IA, -IB and -II was  
26 repeated 3 times using independent extracts. Statistical analyses were performed with ANOVA  
27 followed by Fisher's protected least significant difference test. Significance was accepted at  
28  $p < 0.05$ .

## RESULTS

The main stages of the first lower molar development are presented in Figures 1 and 2. At embryonic day 13 (E13), the epithelium becomes thicker, giving rise to the dental bud, and the mesenchymal cells condense around the epithelial bud (Figure 1A). The dental bud is connected to the oral epithelium by the stalk. At the cap stage (E14-E15), epithelial histogenesis progresses when the inner (IDE) and outer (ODE) dental epithelia become visible and are separated by the stellate reticulum (SR), while a transient structure called the primary enamel knot (PEK) appears in the middle of the enamel organ (Figures 1C and 1D). At the bell stage (E17), the cervical loop delimitates the dental papilla where odontoblast differentiation has not yet started (Figure 2A). At the late bell stage (E19), functional odontoblasts in the mesenchyme are facing preameloblasts and the first polarizing ameloblasts in the IDE (Figure 2F).

### BMPR-IA:

In proteins extracted from the molar, only one protein band of 66 kDa (Nakamura et al. 2003) was detected with the antibody directed against BMPR-IA (Figure 3A). At the bud stage (E13), BMPR-IA was detected throughout the epithelial bud but mainly at the tip as well as in the stalk and the oral epithelium (Figure 1B) while the control remained negative (Figure 1A). At E14, the labeling for BMPR-IA was maintained in the oral epithelium and restricted to the stalk and upper part of the enamel organ (Figure 1C). The protein was also present in the dental mesenchyme (Figure 1C). The *Bmpr1a* gene was expressed in the dental epithelium as well as in the mesenchyme and oral epithelium (Figure 3). At E15 in the enamel organ, BMPR-IA was localized in the cells of the PEK distant from the basement membrane, in the stellate reticulum (SR) and in the ODE (Figure 1D). The staining for BMPR-IA remained strong in the stalk and in the oral epithelium. At this stage, BMPR-IA was also still present in the dental mesenchyme (Figure 1D). At E15, the staining in the mesenchyme appeared heterogeneous, mainly concentrating in the regions where cusps will form 24 hours later (Figure 1D). At the bell stage (E17), the protein was present in the stratum intermedium (SI) (Figures 2A-B). The staining was maintained in the oral epithelium but decreased in the stalk (not shown). At E19, the staining for BMPR-IA was maintained in the SI, while a very weak staining was observed in the IDE and at the apical pole of the polarizing ameloblasts (Figure 2F). Compared to MAPK used as a reference, the amount of BMPR-IA increased from E14 to E19 and was maximal at E19 (Figure 3B).

### BMPR-IB:

The anti-BMPR-IB antibody reacted with a protein showing an apparent molecular weight of 86 kDa (Wu et al. 1996) (Figure 3A). At the bud stage, BMPR-IB was detected in both the epithelium and the condensed mesenchyme surrounding the epithelial bud (Figure 1H). In the

mesenchyme, the staining was stronger on the buccal side (Figure 1H). At E14, the labeling in the epithelium was more pronounced in the IDE than in the ODE (Figure 1I). The inner cells of the PEK were strongly labeled (Figure 1I). At the late cap stage, BMPR-IB was detected in the IDE and a weak staining was observed in the ODE (Figure 1J). RT-PCR showed that the *Bmpr1b* gene was strongly expressed in the dental epithelium compared to the mesenchyme (Figure 3). The relative amount of BMPR-IB slightly decreased from E14 to E17 but increased at the bell stage when cell differentiation was engaged (Figure 4B). At E17, the protein was detected in the IDE (Figure 2E), and at E19 the staining became stronger at the secretory pole of odontoblasts and ameloblasts (Figure 1H).

### **BMPR-II:**

One band was detected with the anti-BMPR-II antibody with an apparent molecular weight 90 kDa (Kim et al. 2000) (Figure 3A and C). At E13, BMPR-II was detected in both the epithelium and mesenchyme (Figure 1D). In the mesenchyme, there was a buccal-lingual asymmetry (Figure 1E) as observed also for BMPR-IB (Figure 1H). A stronger signal for BMPR-II was observed in the internal part of the bud, in the stalk and in the oral epithelium (Figure 1E). At the early cap stage (E14), BMPR-II was mainly localized in the mesenchyme (Figure 1F). However, a very weak staining was also detected in the enamel organ and oral epithelium (Figure 1F). At this stage, the corresponding gene was also weakly expressed in the dental epithelium and in the oral epithelium (Figure 3). At E15, BMPR-II was present in the mesenchyme as well as in the cells of the PEK close to the SI. An intense staining for BMPR-II was observed in the stalk and in the oral epithelium (Figure 1G). In the mesenchyme, the staining for BMPR-II was heterogeneous, showing a similar pattern to BMPR-IA (compare Figure 1D and Figure 1G). The protein was also present in the ODE and in the cells of the SR in contact with these ODE cells (Figure 1G). At E17, a strong staining was detected in the SI (Figures 2C-D). At E19, the staining was maintained in the SI and became apparent in the basal and apical poles? of the ameloblasts (Figure 2G).

## DISCUSSION

Tooth development is characterized by different steps: 1) the transition from bud to cap stage is a critical step with the appearance of the primary enamel knot (PEK), which controls cusp formation. 2) the cap to bell transition, when the cervical loop extends and progressively delimits the dental papilla. 3) the functional differentiation of odontoblasts and ameloblasts. Functional studies have shown that BMP-2 and BMP-4 have differential effects during tooth development (for review see Wozney 1998). The transduction of BMP signaling is mediated by Smads through protein-protein and protein-DNA interactions (Attisano and Tuen Lee-Hoeflich 2001).

At the bud stage, BMPR-IB and -II as well as BMP-2/-4 (Nadiri et al. 2004) were detected in the mesenchyme. This colocalization was reinforced by a similar buccal-lingual asymmetry, as observed for the four antigens. BMP-2 and BMP-4 require the dimerization of type I and type II receptors for optimal binding and signal transduction. They initially bind to BMPR-II, which may form a heteromeric complex with either BMPR-IA or -IB, and exhibit different affinities for the various combinations. These differences in the binding affinities may correlate with the overlapping but also distinct functional effects of BMPs during organogenesis (Panchision et al. 2001; Zou et al. 1997). The higher affinity of BMPR-II for BMPR-IB versus -IA favors the formation of BMPR-IB/II dimers (Liu et al. 1995; Nohe et al. 2002). BMPR-IB and BMPR-II are expressed in the mesenchyme at E13 and might thus mediate the effect of BMP-4, suggested to be involved in the condensation of the dental mesenchyme at the bud stage (Hall and Miyake 1995; Lu et al. 2000). At E13, BMPR-IA in the dental epithelium was restricted to the tip of bud, where the precursor of the PEK starts to form and where BMPR-II is also present. The dimer BMPR-IA/II might thus be involved in mediating the effect of BMP-2 in inducing the formation of the PEK (Aberg et al. 1997). The localization of three receptors described here suggests that at the bud stage the formation of functional dimers was tissue specific. BMPR-II cooperated with -IB and to a lesser extent with -IA in binding BMP-4 to stimulate mesenchymal cell condensation, while it cooperated with -IA and to a lesser extent with -IB to bind BMP-2 in the dental epithelium.

At the cap stage (E14), the histogenesis of different compartments of the enamel organ became much more complex with the appearance of the SR, ODE, IDE and PEK. At this stage, only BMP-4 and BMPR-IB proteins were present in the enamel organ, especially in the forming IDE. The localization of BMPR-IB does not correlate with cell proliferation since it is detected in cells of the IDE, which divide at this stage, but also in the PEK cells, most of which do not divide (réf). Although it might be involved in epithelial histogenesis, BMP-4 signaling requires the

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

dimerization of the two receptors for optimal binding, and it has been shown that BMP-4 does not bind to ActR-II or ActR-I (Kim et al. 2000). BMPR-II could not be detected in the enamel organ, which suggests the existence of another type II receptor. At E14, BMP-4 was shown to stimulate mesenchymal cell proliferation (Vainio et al. 1991). This effect could be mediated by BMPR-IA/II since the two molecules were detected in the mesenchyme. Such a possibility has been suggested for epithelial cells in the developing limb and hair follicle (Panchision et al. 2001; Andl et al. 2004). However, the situation seems to be different in the molar since, as discussed above, BMP-4 and BMPR-IB were detected in the PEK where most cells do not divide. All together, these observations suggest that BMP signaling in the developing tooth is tissue specific and may vary in different regions of the same tissue.

Compared to E14, the relative amounts of BMPR-IA, and -II increased in the whole tooth germ at E15, as does BMP-4 (Nadiri et al. 2004), while during the same period the relative amount of BMP-2 decreased. During the cap stage, from E14 to E15, there was also a major change in the pattern of expression of BMP receptors. BMPR-II became strongly expressed in the stalk at E15 and also in the dental epithelial cells underlying the ODE, mainly on the lingual side. BMP-4 showed the same pattern (Nadiri et al. 2004). At this stage, BMP-4, BMPR-IA and -II were restricted to the internal part of the PEK and to the stalk, two areas where apoptosis accumulates. This observation supports the possible role of BMP-4 in inducing cell death as shown during limb bud development (Montero et al. 2001) and suggested during tooth development (Peterkova et al. 2003; Matalova et al. 2004). At the same time, BMP-4, BMPR-IA and -II showed a heterogeneous distribution in the mesenchyme. The three molecules concentrated in regions of the mesenchyme where cusps will form 24 hours later. BMP-4 might be involved in controlling tooth morphogenesis by a spatial regulation of both cell proliferation in the mesenchyme and apoptosis in the epithelium.

At E19, BMPR-IB and BMPR-II were detected in the dental pulp, including odontoblasts. Experimental approaches *in vitro* using isolated dental papillae have shown that BMP-2 and BMP-4 proteins can induce the functional differentiation of odontoblasts (Bègue-Kirn et al. 1992). Immunostaining for BMP-2 and BMP-4 (Nadiri et al. 2004) and their receptors suggested that these two BMPs indeed would be physiologically involved in the induction of both odontoblast and ameloblast differentiation. The terminal differentiation of ameloblasts is controlled by the mesenchyme and occurs 24 hours after the differentiation of odontoblasts. In the absence of mesenchyme, preameloblasts of isolated enamel organs cultured *in vitro* do not differentiate as ameloblasts. However, in the absence of mesenchyme, cell-free predentin/dentin can induce the terminal differentiation of ameloblasts (Karcher-Djuricic et al. 1985). Predentin/dentin contains

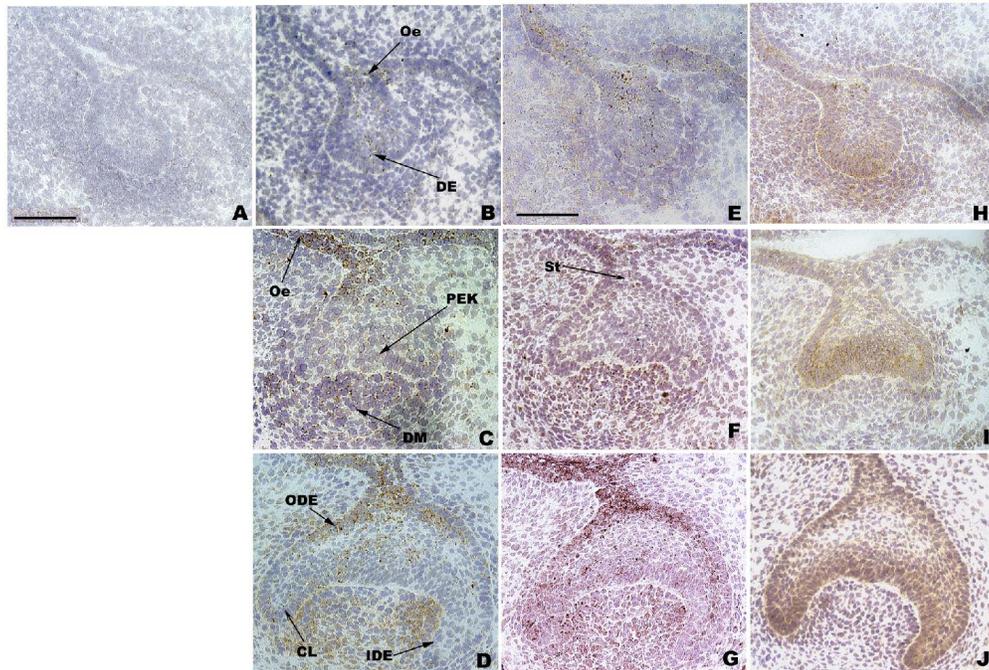
1  
2  
3 molecules from the TGF- $\beta$  superfamily and odontoblasts express these molecules, including  
4 BMP-2 and BMP-4 (Bègue-kirn et al. 1994). Immobilized BMP-2 has been shown to induce the  
5 differentiation of functional ameloblasts (Coin et al., 1999). However, odontoblasts may not be the  
6 only source of BMPs. Although *in situ* hybridization showed that odontoblasts express Bmp-2  
7 much more strongly and long before cells of the SI (Bègue-Kirn et al. 1994), the SI is positive for  
8 BMP-2 at E19 (Nadiri et al. 2004). These two sets of observations suggest a functional role for the  
9 SI. At E17 and still at E19, an intense staining for BMPR-IA/-II was observed in the SI, indicating  
10 that this cell layer is also responsive to BMPs. In the SI, the immunostaining for BMPR-IA/-II  
11 thus precedes that for BMP-2. It also anticipates by 48 hours the expression of the BMP receptors  
12 in the IDE. Although the exact role of the SI is not clear yet, it might initially be involved in the  
13 reorganization of the IDE when it becomes a monolayer at E17. Shh is involved in this epithelial  
14 reorganization (Lesot et al., 2002) and is present in the SI before it can be detected in the IDE  
15 (Koyama et al., 2001). BMP-2 might act as the product of a gene downstream of Shh  
16 (Drossopoulou et al. 2000; Law et al., 2002) and/or by antagonizing the effect of Shh on cell  
17 proliferation (Rios et al., 2004).  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28

29 During tooth development, the cellular events that may be stimulated by BMP-2 and -4 vary:  
30 cell proliferation and apoptosis at early stages, cell differentiation at late stages. The relative  
31 amounts of BMP-2 and BMP-4 also change during tooth development (Nadiri et al. 2004). It has  
32 been shown that different cellular events may be induced by BMPs in a dose-dependent manner.  
33 While cell proliferation is promoted by low doses of BMPs, acting through Pax3, at higher doses,  
34 BMPs promote the repression of Pax3 and the terminal differentiation of myogenic cells (Amthor  
35 et al. 1998, 1999). The variations in the relative amounts of BMP-2 and -4, together with the  
36 changes in the pattern of expression of their receptors, as illustrated here, might thus explain how  
37 the two BMPs may stimulate different cellular activities.  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

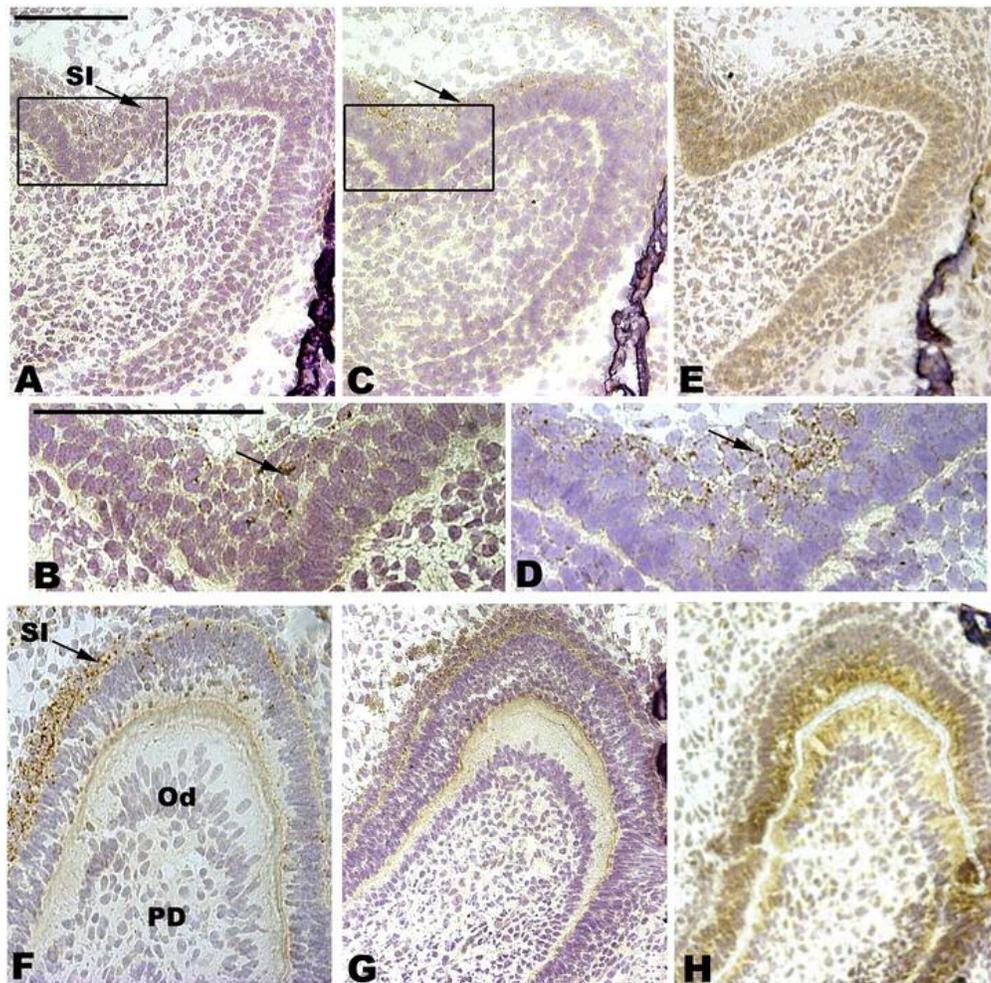
- 1  
2  
3  
4 Aberg T, Wozney J, Thesleff I (1997) Expression patterns of bone morphogenetic proteins (Bmps)  
5 in the developing mouse tooth suggest roles in morphogenesis and cell differentiation. *Dev Dyn*  
6 210:383-396.  
7  
8  
9  
10 Amthor H, Christ B, Weil M, Patel K (1998) The importance of timing differentiation during limb  
11 muscle development. *Curr Biol* 8:642-652.  
12  
13 Amthor H, Christ B, Patel K (1999) A molecular mechanism enabling continuous embryonic  
14 muscle growth - a balance between proliferation and differentiation. *Development* 126:1041-  
15 1053.  
16  
17  
18 Andl T, Ahn K, Kairo A, Chu EY, Wine-Lee L, Reddy ST, Croft NJ, Cebra-Thomas JA, Metzger  
19 D, Chambon P, Lyons KM, Mishina Y, Seykora JT, Crenshaw EB 3rd, Millar SE (2004)  
20 Epithelial *Bmpr1a* regulates differentiation and proliferation in postnatal hair follicles and is  
21 essential for tooth development. *Development* 131:2257-2268.  
22  
23  
24  
25  
26 Attisano L, Tuen Lee-Hoeflich S (2001) The Smads. *Genome Biol*.  
27  
28 Bègue-Kirn C, Smith AJ, Ruch JV, Wozney JM, Purchio A, Hartmann D, Lesot H (1992) Effects  
29 of dentin proteins, transforming growth factor beta 1 (TGF beta 1) and bone morphogenetic  
30 protein 2 (BMP2) on the differentiation of odontoblast in vitro. *Int J Dev Biol* 36:491-503.  
31  
32 Bègue-Kirn C, Smith AJ, Lorient M, Kupferle C, Ruch JV, Lesot (1994) Comparative analysis of  
33 TGF beta s, BMPs, IGF1, msxs, fibronectin, osteonectin and bone sialoprotein gene expression  
34 during normal and in vitro-induced odontoblast differentiation. *Int J Dev Biol* 38:405-420.  
35  
36  
37 Coin R, Haikel Y, Ruch JV (1999) Effects of apatite, transforming growth factor beta-1, bone  
38 morphogenetic protein-2 and interleukin-7 on ameloblast differentiation in vitro. *Eur J Oral Sci*  
39 107:487-495.  
40  
41  
42  
43 Dewulf N, Verschueren K, Lonnoy O, Moren A, Grimsby S, Vande Spiegle K, Miyazono K,  
44 Huylebroeck D, Ten Dijke P (1995) Distinct spatial and temporal expression patterns of two  
45 type I receptors for bone morphogenetic proteins during mouse embryogenesis. *Endocrinology*  
46 136:2652-2663.  
47  
48  
49  
50 Drossopoulou G, Lewis KE, Sanz-Ezquerro JJ, Nikbakht N, McMahon AP, Hofmann C, Tickle C  
51 (2000) A model for anteroposterior patterning of the vertebrate limb based on sequential long-  
52 and short-range Shh signalling and Bmp signalling. *Development* 127:1337-1348.  
53  
54  
55 Hall BK, Miyake T (1995) Divide, accumulate, differentiate: cell condensation in skeletal  
56 development revisited. *Int J Dev Biol* 39:881-893.  
57  
58  
59 Karcher-Djuricic V, Staubli A, Meyer JM, Ruch JV (1985) Acellular dental matrices promote  
60 functional differentiation of ameloblasts. *Differentiation* 29:169-175.

- 1  
2  
3 Kim IY, Lee DH, Ahn HJ, Tokunaga H, Song W, Devereaux LM, Jin D, Sampath TK, Morton RA  
4 (2000) Expression of bone morphogenetic protein receptors type-IA, -IB and -II correlates with  
5 tumor grade in human prostate cancer tissues. *Cancer Res* 60:2840-2844.  
6  
7 Koyama E, Wu C, Shimo T, Iwamoto M, Ohmori T, Kurisu K, Ookura T, Bashir MM, Abrams  
8 WR, Tucker T, Pacifici M (2001) Development of stratum intermedium and its role as a Sonic  
9 hedgehog-signaling structure during odontogenesis. *Dev Dyn* 222:178-191.  
10  
11 Kwon YK, Bhattacharyya A, Alberta JA, Giannobile WV, Cheon K, Stiles CD, Pomeroy SL  
12 (1997) Activation of ErbB2 during wallerian degeneration of sciatic nerve. *J Neurosci* 17:8293-  
13 8299.  
14  
15 Law LY, Lin JS, Becker DL, Green CR (2002) Knockdown of connexin43-mediated regulation of  
16 the zone of polarizing activity in the developing chick limb leads to digit truncation. *Dev*  
17 *Growth Differ* 44:537-547.  
18  
19 Lesot H, Kieffer-Combeau S, Fausser JL, Meyer JM, Perrin-Schmitt F, Peterkova R, Peterka M,  
20 Ruch JV (2002) Cell-cell and cell-matrix interactions during initial enamel organ  
21 histomorphogenesis in the mouse. *Connect Tissue Res* 43:191-200.  
22  
23 Liu F, Ventura F, Doody J, Massague J (1995) Human type II receptor for bone morphogenic  
24 proteins (BMPs): extension of the two-kinase receptor model to the BMPs. *Mol Cell Biol*  
25 15:3479-3486.  
26  
27 Lu H, Jin Y, Tipoe GL (2000) Alteration in the expression of bone morphogenetic protein-2, 3, 4,  
28 5 mRNA during pathogenesis of cleft palate in BALB/c mice. *Arch Oral Biol* 45:133-140.  
29  
30 Matalova E, Tucker AS, Sharpe PT (2004) Death in the life of a tooth. *J Dent Res* 83:11-16.  
31  
32 Montero JA, Ganan Y, Macias D, Rodriguez-Leon J, Sanz-Ezquerro JJ, Merino R, Chimal-  
33 Monroy J, Nieto MA, Hurlle JM (2001) Role of FGFs in the control of programmed cell death  
34 during limb development. *Development* 128:2075-2084.  
35  
36 Nadiri A, Kuchler-Bopp S, Haikel Y, Lesot H (2004) Immunolocalization of BMP-2/-4, FGF-4,  
37 and WNT10b in the developing mouse first lower molar. *J Histochem Cytochem* 52:103-112.  
38  
39 Nohe A, Hassel S, Ehrlich M, Neubauer F, Sebald W, Henis YI, Knaus P (2002) The mode of  
40 bone morphogenetic protein (BMP) receptor oligomerization determines different BMP-2  
41 signaling pathways. *J Biol Chem* 277:5330-5338.  
42  
43 Nakamura Y, Wakitani S, Nakayama J, Wakabayashi S, Horiuchi H, Takaoka K 2003 Temporal  
44 and spatial expression profiles of BMP receptors and noggin during BMP-2-induced ectopic  
45 bone formation. *J Bone Miner Res* 18:1854-1862.  
46  
47 Onishi T, Ishidou Y, Nagamine T, Yone K, Imamura T, Kato M, Sampath TK, ten Dijke P,  
48 Sakou T (1998) Distinct and overlapping patterns of localization of bone morphogenetic protein  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

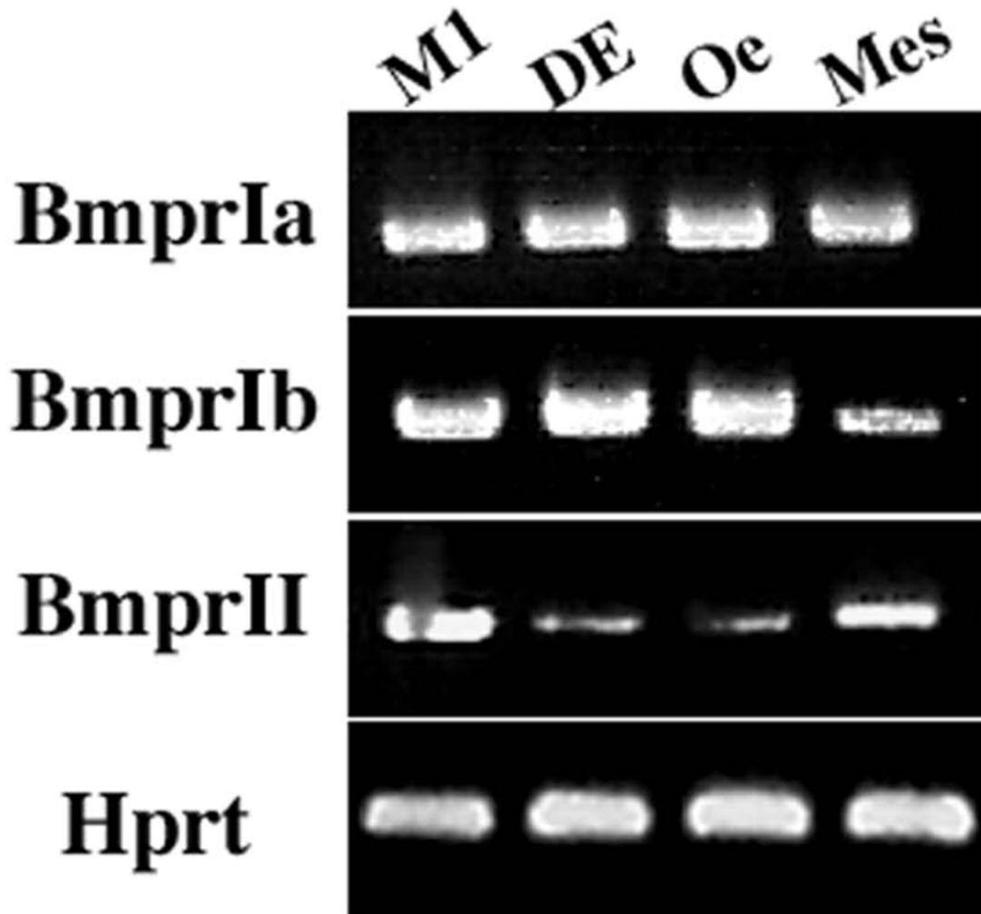
- 1  
2  
3 (BMP) family members and a BMP type II receptor during fracture healing in rats. *Bone*  
4 22:605-612.
- 5  
6 Panchision DM, Pickel JM, Studer L, Lee SH, Turner PA, Hazel TG, McKay RD (2001)  
7 Sequential actions of BMP receptors control neural precursor cell production and fate. *Genes*  
8 *Dev* 15:2094-2110.
- 9  
10 Peterkova R, Peterka M, Lesot H (2003) developing mouse dentition: a new tool for apoptosis  
11 study. *Ann N Y Acad Sci* 10:453-466.
- 12  
13 Schmitt R, Lesot H, Vonesch JL, Ruch JV (1999) Mouse odontogenesis in vitro: the cap-stage  
14 mesenchyme controls individual molar crown morphogenesis. *Int J Dev Biol.* 43:255-260.
- 15  
16 Rios I, Alvarez-Rodriguez R, Marti E, Pons S (2004) Bmp2 antagonizes sonic hedgehog-mediated  
17 proliferation of cerebellar granule neurones through Smad5 signalling. *Development* 131:3159-  
18 3168.
- 19  
20 Vainio S, Jalkanen M, Vaahtokari A, Sahlberg C, Mali M, Bernfield M, Thesleff I (1991)  
21 Expression of syndecan gene is induced early, is transient, and correlates with changes in  
22 mesenchymal cell proliferation during tooth organogenesis. *Dev Biol* 147:322-333.
- 23  
24 Verschueren K, Dewulf N, Goumans MJ, Lonnoy O, Feijen A, Grimsby S, Vandi Spiegle K, Ten  
25 Dijke P, Moren A, Vanscheeuwijck P (1995) Expression of type I and type IB receptors for  
26 activin in midgestation mouse embryos suggests distinct functions in organogenesis. *Mech Dev*  
27 52:109-123.
- 28  
29 von Bubnoff A, Cho KW (2001) Intracellular BMP signaling regulation in vertebrates: pathway or  
30 network?. *Dev Biol* 239:1-14.
- 31  
32 Wordinger RJ, Agarwal R, Talati M, Fuller J, Lambert W, Clark AF (2002) Expression of bone  
33 morphogenetic proteins (BMP), BMP receptors, and BMP associated proteins in human  
34 trabecular meshwork and optic nerve head cells and tissues. *Mol Vis* 8:241-250.
- 35  
36 Wozney JM (1998) The bone morphogenetic protein family: multifunctional cellular regulators in  
37 the embryo and adult. *Eur J Oral Sci* 1:160-66.
- 38  
39 Wu X, Robinson CE, Fong HW, Gimble JM (1996) Analysis of the native murine bone  
40 morphogenetic protein serine threonine kinase type I receptor (ALK-3). *J Cell Physiol* 168:453-  
41 461.
- 42  
43 Zou H, Wieser R, Massague J, Niswander L (1997) Distinct roles of type I bone morphogenetic  
44 protein receptors in the formation and differentiation of cartilage. *Genes Dev* 11:2191-2203.
- 45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60



**Figure 1. Immunolocalization of BMPR-IA (B, C, D), -II (E, F, G) and -IB (H, I, J) in the developing first lower mouse molar at the bud (B, E, H), early cap (C, F, I) and late cap (D, G, J) stages. At the bud stage, BMPR-IB (H) and -II (E) were detected in the epithelium and mesenchyme while BMPR-IA (B) was only present at the tip of epithelial bud. At E15, BMPR-IA (D) and -II (G) were localized in the internal part of the PEK and -IB (J) in all PEK cells. CL, cervical loop; DE, dental epithelium; DM, dental mesenchyme; DP, dental papilla; PEK, primary enamel knot; IDE, internal dental epithelium; ODE, outer dental epithelium; Oe, oral epithelium; SI, stratum intermedium; SR, stellate reticulum; St, stalk. Bars = 100  $\mu$ m.  $\mu$**   
 343x231mm (150 x 150 DPI)

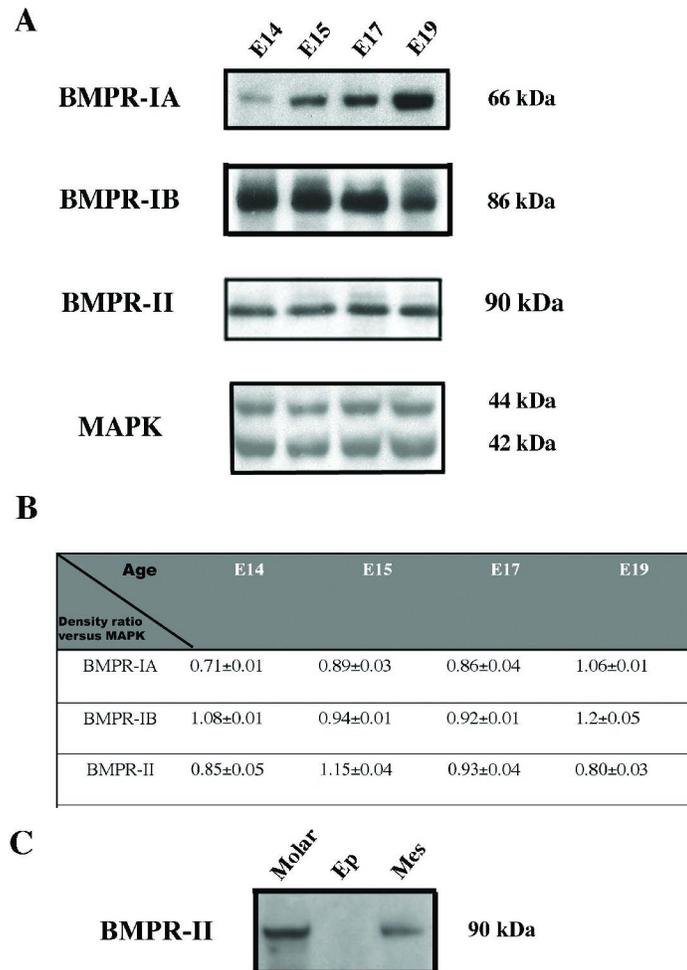


**Figure 2. Immunolocalization of BMPR-IA (A, B, F), -II (C, D, G) and IB (E, H) at the early (A, B, C, D, E) and late (F, G, H) bell stages. At E17, strong stainings for BMPR-IA and BMPR-II were observed in the SI (A-D), while BMPR-IB was present in all IDE cells (E). At E19, BMPR-IB (H) and -II (G) were detected in the apical and basal poles of ameloblasts and the staining in the SI for BMPR-IA (F) was strong. CL, cervical loop; DP, dental papilla; SI, stratum intermedium; Od, odontoblasts. Bars = 100  $\mu$ m. <sup>H</sup>**  
 122x121mm (150 x 150 DPI)



**Figure 3. Representative semi-quantitative RT-PCR of BmprIA, BmprIB and BmprII mRNAs in the molar at E14. Photos shows transcripts from BmprIA, BmprIB and BmprII in the first lower molar (M1), isolated dental epithelium (DE), oral epithelium (Oe) and mesenchyme (Mes), compared with the expression of Hprt. Amplifications were performed with specific primers on 1 $\mu$ l of cDNA prepared from mRNA. Amplifications were independently performed three times with similar results.  $\mu$**

184x170mm (150 x 150 DPI)



**Figure 4. A.** Western blot analysis of BMPR-IA, BMPR-IB and BMPR-II in the developing first mouse molar at E14, E15, E17 and E19. BMPR-IA was detectable from E14 to E19 and showed a slight increase from E15 to E19, however, the expression level of BMPR-IB and BMPR-II seemed to be unchanged from E14 to E19. MAPK was used as an internal reference protein. **B.** Table 1. Density ratio of receptors versus MAPK during first lower molar development. Blots were scanned and the signal intensity for each band was determined using NIH Image 1.63 software. To eliminate possible variations in the amount of samples separated on gels, the data were normalized against MAPK and the density ratio (antigen/MAPK) calculated for each antigen at each stage. The data are presented as the mean ratio  $\pm$  SEM. **C.** Western blot analysis of BMPR-II in tooth germ

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

**and dissociated tissues at E14. BMPR-II protein was present in first lower molars and in isolated dental mesenchymes (Mes), but not in isolated dental epithelia (Ep).**

For Peer Review

### 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

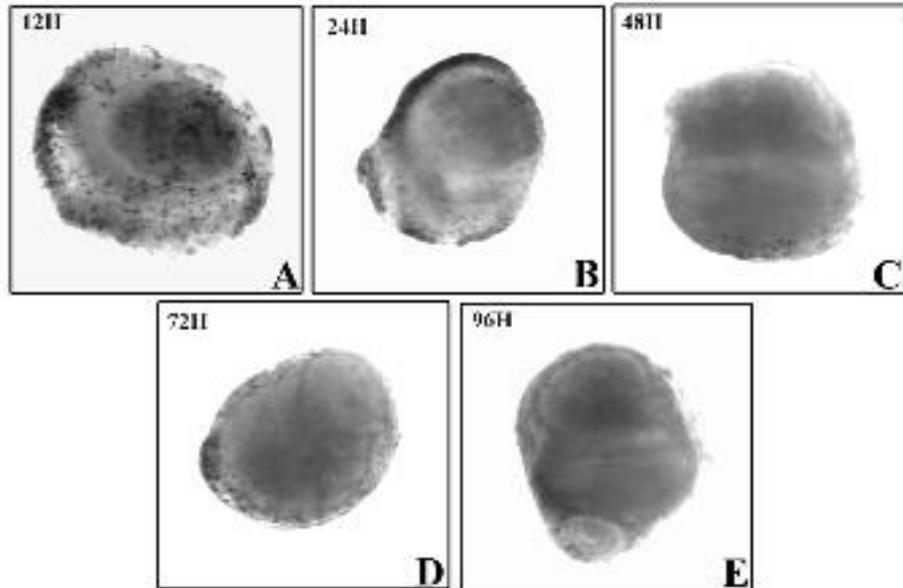


Figure 7: Localisation des apoptoses par la technique TUNEL en whole-mount au cours du développement *in vitro* de réassociations entre mésenchyme et cellules épithéliales dissociées.

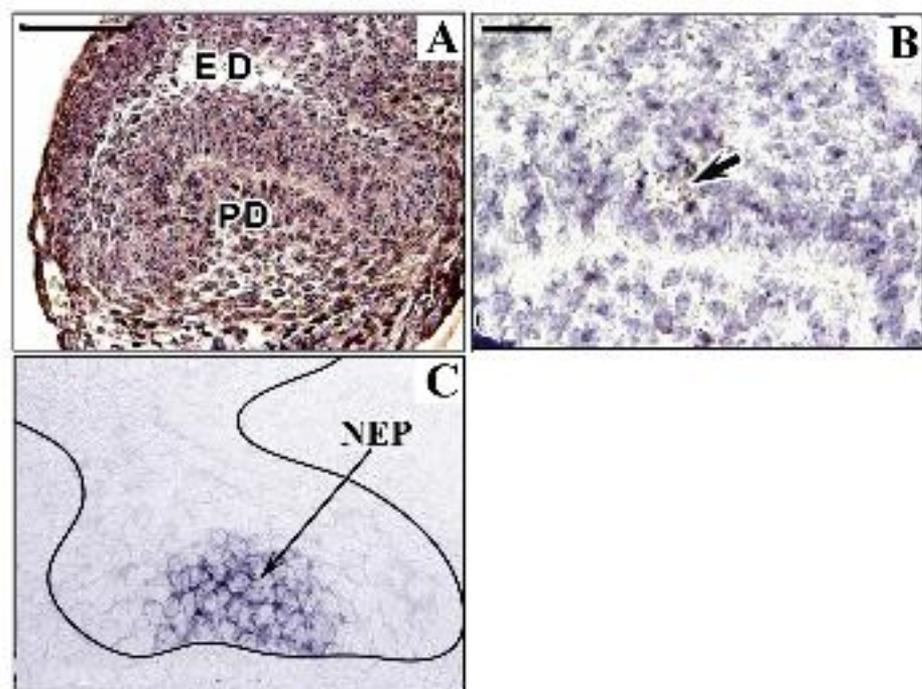
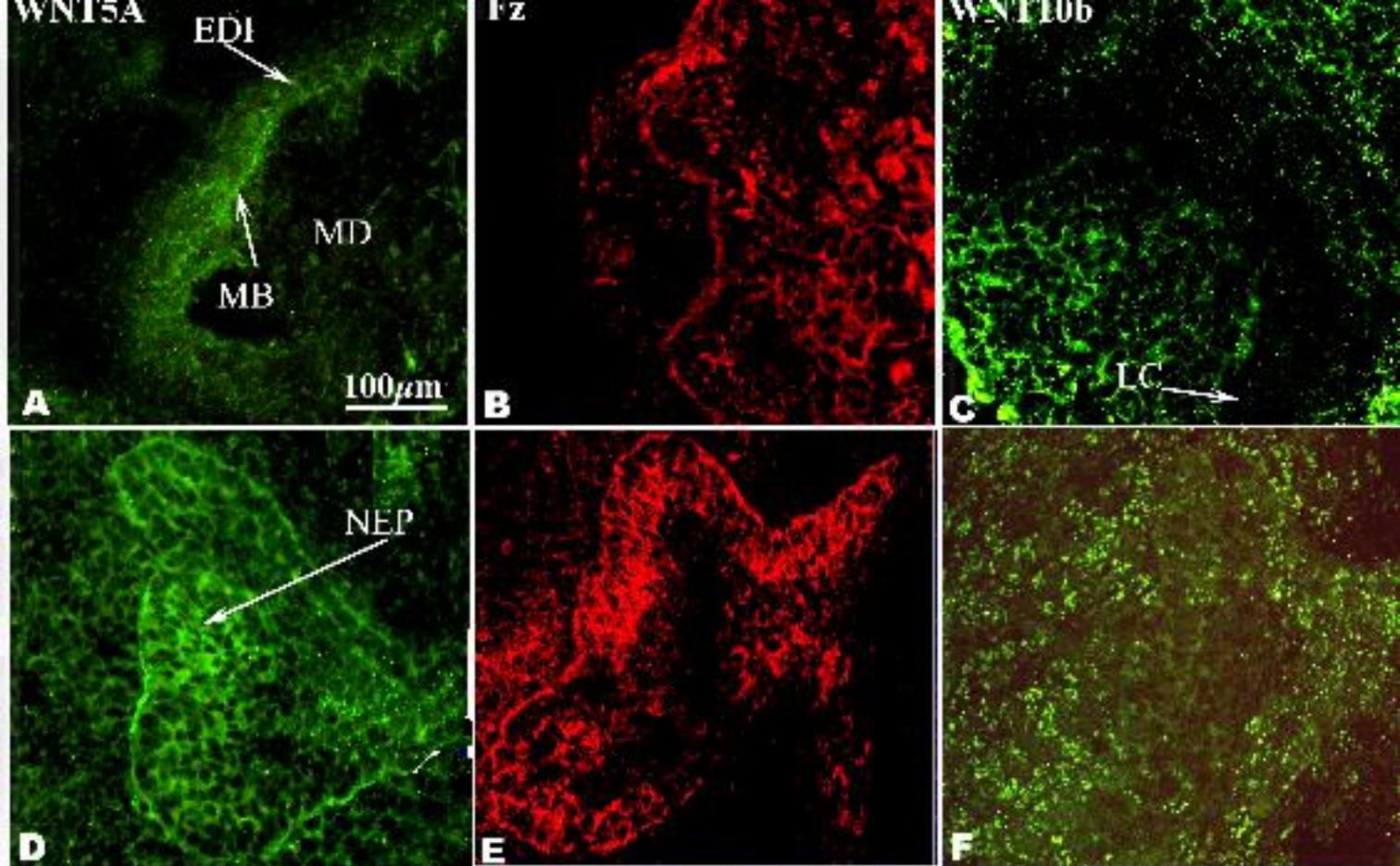
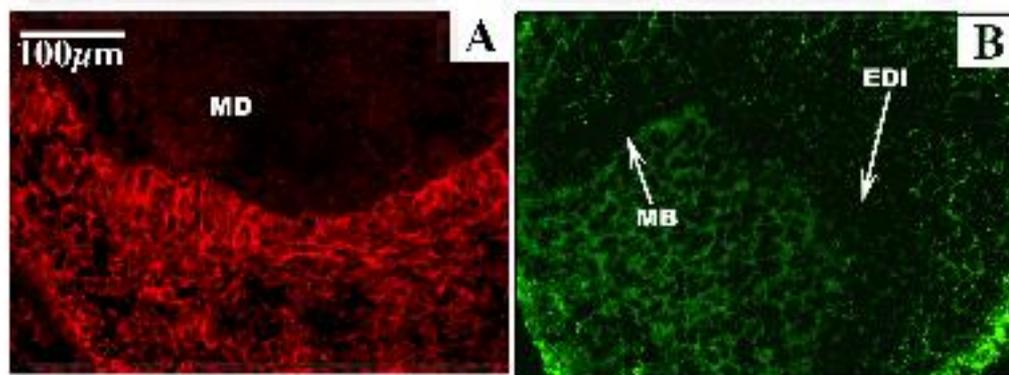


Figure 8: Coupes histologiques après 3j de culture (A, B, C) de recombinaisons entre mésenchyme au stade de capuchon et cellules épithéliales. A- coloration histologique au Mallory; B- localisation des apoptoses par l'immunolocalisation de ss-DNA; C- expression de Shh. Barre= 100µm



**Figure 9: Immunolocalisation de WNT5a, Fz et WNT10b** au niveau de réassociations entre mésenchyme et cellules épithéliales après 3j de culture (A, B, C), et au niveau de la première molaire inférieure (D, E et F).

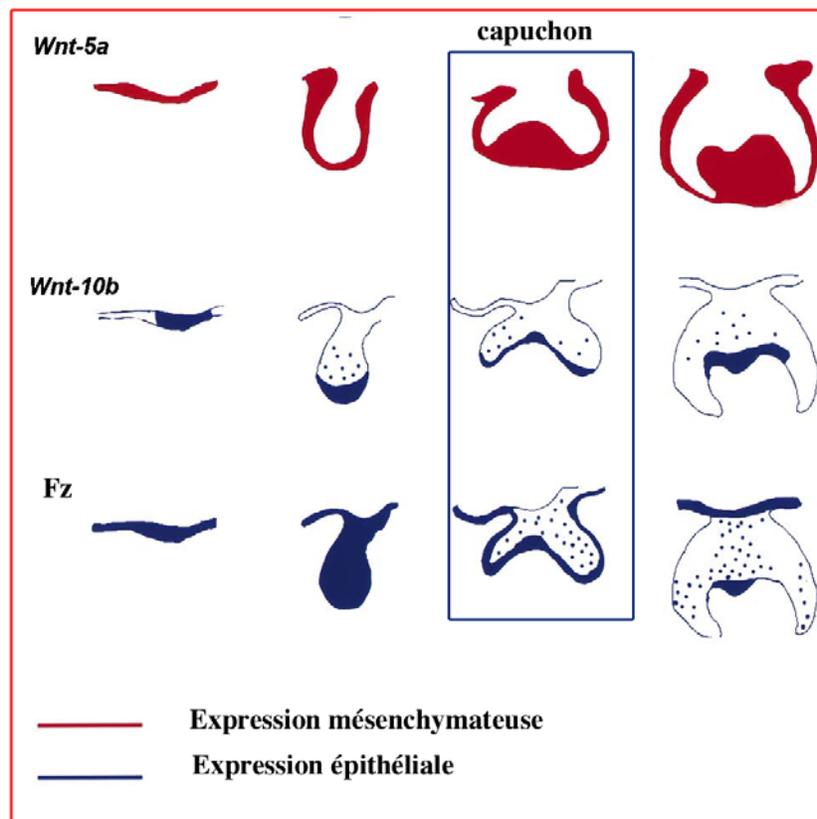


**Figure 10 : Immunolocalisation de la  $\beta$ -caténine (A) et FGF-4 (B)** au niveau des réassociations entre mésenchyme dentaire et cellules épithéliales après 3j de culture.

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)**

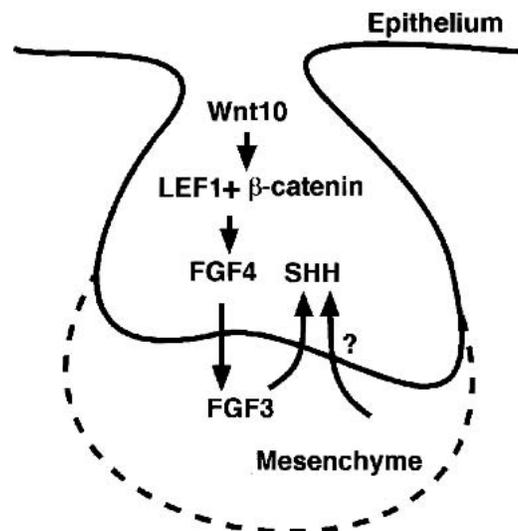
Par rapport à l'expression des gènes (Schéma 1), l'immunolocalisation des protéines correspondantes aussi bien au niveau des réassociations *in vitro* qu'au niveau de la molaire inférieure montre une distribution spatiale différente qui peut être en partie due à leur interaction avec les

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

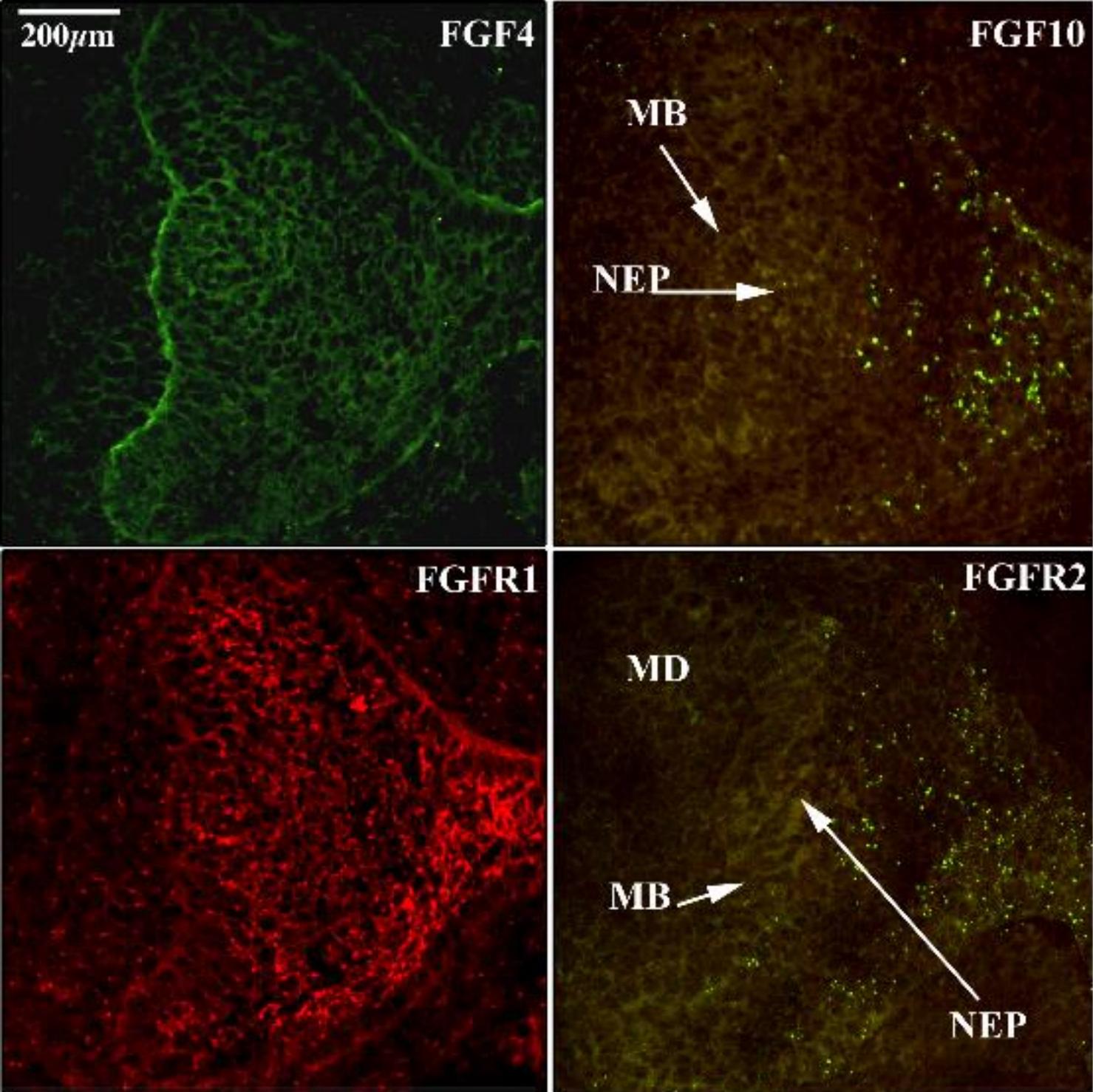
La technique utilisée est la même que celle utilisée pour la détection de l'apoptose dans la partie 3.2.2.

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

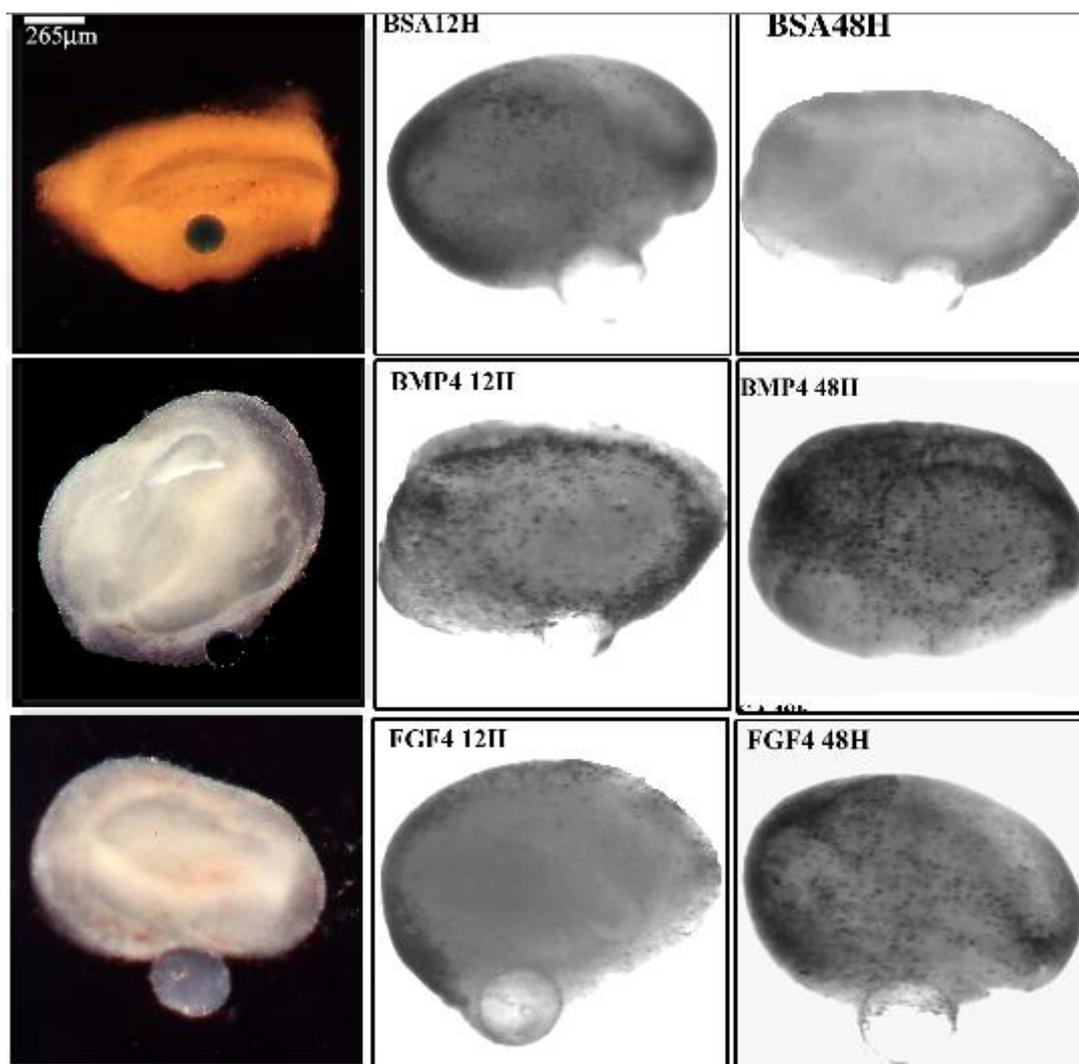
L'hybridation *in situ* est réalisée sur les explants selon plusieurs étapes :

- 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,

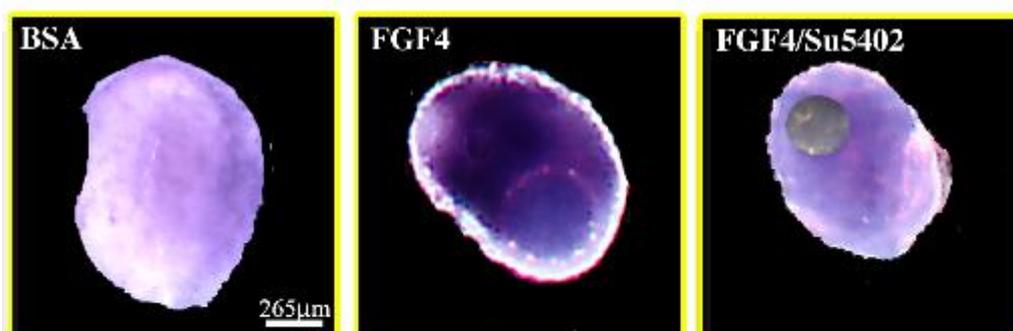
- Traitement par 6 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dans le PBT, 1h à température ambiante (TA),
- 3 lavages au PBT,
- Traitement avec la Protéinase K diluée dans le PBT (10 µg/ml), 10min,
- Lavage à la glycine à 2 mg/ml dans le PBT,
- Lavages PBT,
- Post-fixation avec le mélange PFA 4%, 0.2% glutaraldéhyde 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'anticorps secondaire Anti-DiG (1/1000), couplé à la AP (Phosphatase alcaline),



**Figure 11: Immunolocalisation de FGF-4, FGF-10, FGFR1 et FGFR2 dans la première molaire inférieure à E14.**



**Figure 12: Localisation des apoptoses en whole-mount dans la première molaire.** Après 12H et 48H de culture en présence de billes: BSA, BMP-4 et FGF-4.



**Figure 13: Hybridation in situ en whole mount de Msx2 sur un mésenchyme dentaire.** Après 48H de culture en présence de billes: BSA, FGF-4 et FGF-4/Su5402.

- 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**

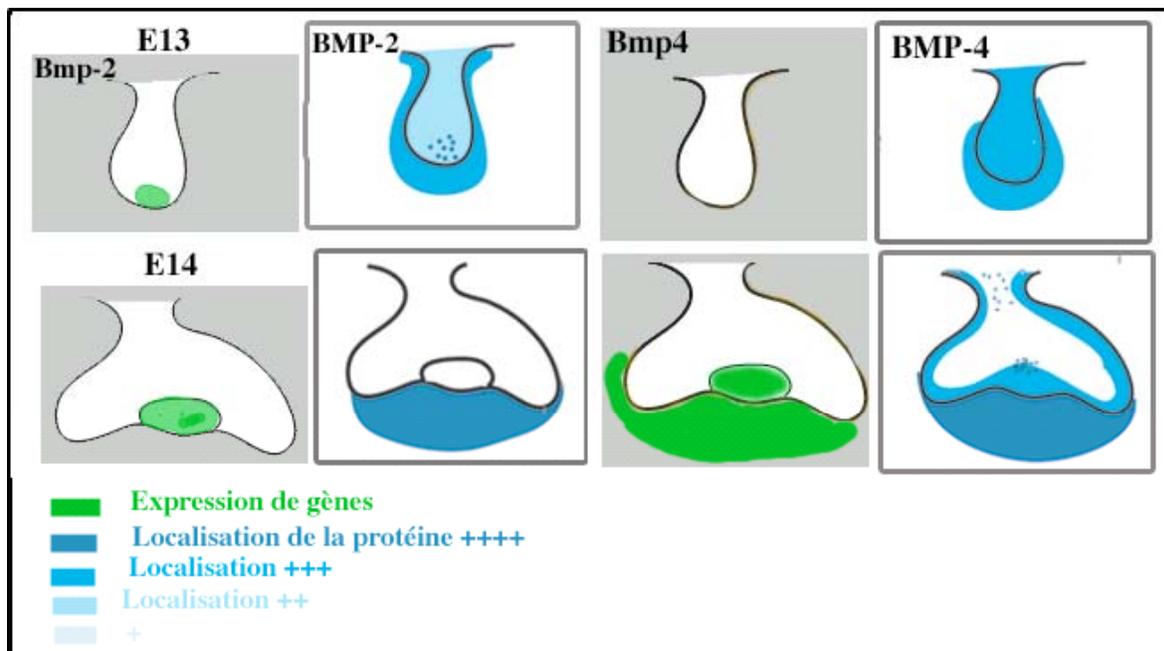
Il est admis que la transition bourgeon-capuchon est une étape critique au cours du développement dentaire, en particulier avec la mise en place du NEP. Dans la molaire, le NEP a été décrit comme une structure formée de cellules ayant un agencement concentrique, ne se divisant plus et présentant localement 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 cuspides 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).

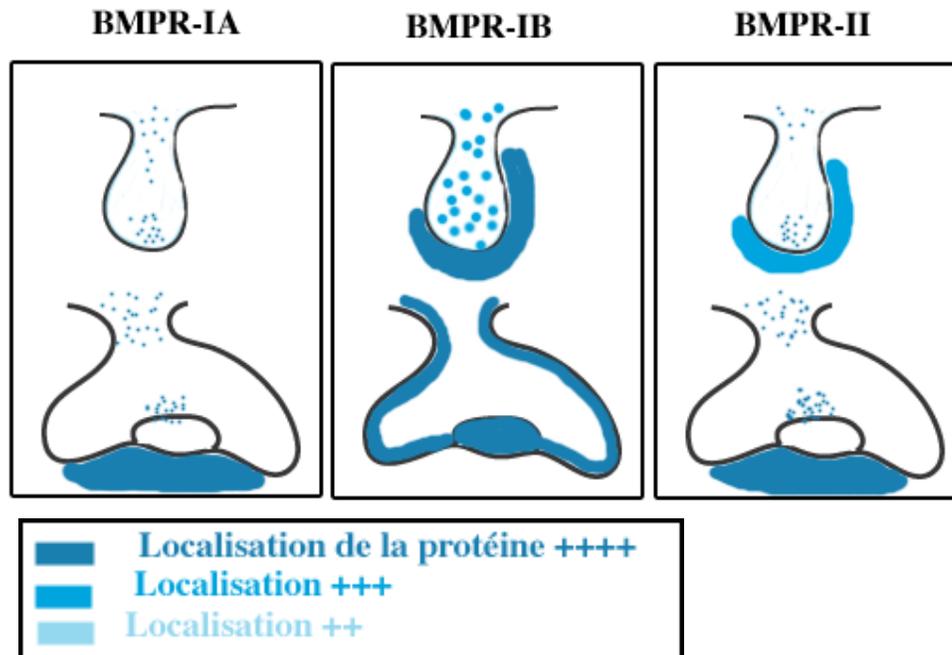
Dès le stade du bourgeon, on remarque l'expression intense de plusieurs gènes codant pour des molécules de signalisation (Bmp-2, Fgf-4 et Wnt10b) et facteurs de transcription (p21, Msx2 et Lef1) dans un sous-ensemble de cellules situées au sommet du bourgeon. Peu d'études ont porté sur la nature de ce 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  $M_1$  à E13 et E14.**

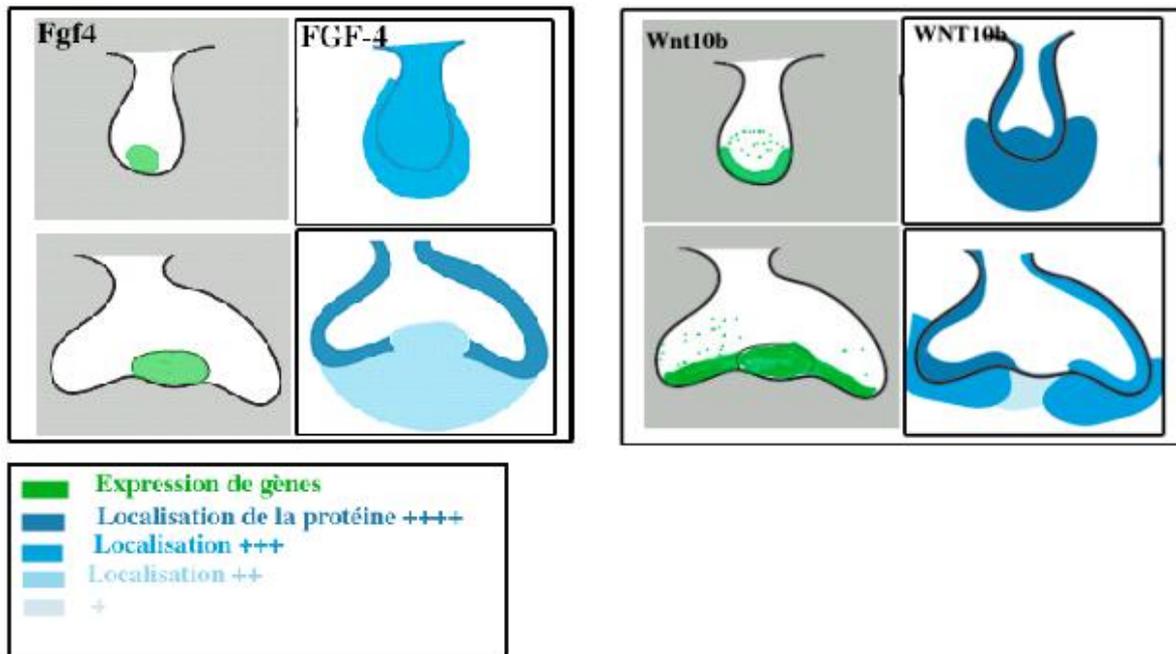


**Schéma 4 : Localisation de BMPR-I, BMPR-IB et BMPR-II dans la  $M_1$  à E13 et E14**

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 sulfate (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<sub>1</sub> 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 celle 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 cuspide, 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 cytotologique 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 cette 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)

**Dental Epithelial Histo-morphogenesis *in vitro*.**

B. Hu<sup>1,2</sup>, A. Nadiri<sup>1</sup>, S. Bopp-Küchler<sup>1</sup>, F. Perrin-Schmitt<sup>3</sup>, and H. Lesot<sup>1\*</sup>

1. UMR INSERM 595, Faculté de Médecine, Université Louis Pasteur, Strasbourg, France

2. Molecular Laboratory for Gene Therapy, Faculty of Stomatology, Capital University of Medical Sciences, Beijing, P.R.China

3. UMR 7104 CNRS-ULP INSERM U596, Faculté de Médecine, Strasbourg, France

Corresponding author:

Hervé Lesot

UMR INSERM 595, Faculté de Médecine, 11 rue Humann, 67085 Strasbourg Cedex, France

Phone: (33) 3 90 24 33 78

Fax: (33) 3 90 24 35 64

E-mail: [Herve.Lesot@odonto-ulp.u-strasbg.fr](mailto:Herve.Lesot@odonto-ulp.u-strasbg.fr)

Running Title: Dental epithelial histogenesis *in vitro*

Key words: epithelial-mesenchymal interaction, epithelial histogenesis, positional information, odontogenesis, tissue engineering.

**ABSTRACT:**

Recent developments in tooth tissue engineering need to understand the regulatory processes to be preserved to achieve histo-morphogenesis and cell-differentiation, especially for enamel tissue engineering. Using mouse first lower molars, our objectives were: 1) to determine whether the cap-stage dental mesenchyme can control the dental epithelial histogenesis, 2) to test the role of the primary enamel knot (PEK) in specifying the potentialities of the dental mesenchyme, and 3) to evaluate the importance of positional information in epithelial cells. After tissue dissociation, the dental epithelium was further dissociated into individual cells, reassociated with dental mesenchyme and cultured. Epithelial cells showed a high plasticity: despite a complete loss of positional information, they rapidly underwent a typical dental epithelial histogenesis. This was stimulated by the mesenchyme. Experiments performed at E13 demonstrated that the initial potentialities of the mesenchyme are not specified by the PEK. Positional information of dental epithelial cells does not require the memorization of their history.

## INTRODUCTION

Recent approaches on tooth engineering (Dualibi *et al.*, 2004; Ohazama *et al.*, 2004) address several questions about critical regulatory processes to be preserved. This is especially pertinent to enamel tissue engineering, a very problematical area. From the bud to the bell stage during development, the histo-morphogenesis of the enamel organ ends up with the formation of the inner dental epithelium (IDE), outer dental epithelium (ODE), primary enamel knot (PEK), as well as the later segregation of the PEK cells in contact with the basement membrane (Coin *et al.*, 1999). This involves differential mitotic activities, apoptosis, cell adhesion and cell segregation. Since these activities are regulated in time and space, positional information is particularly important. Positional information is specified by gradients of morphogens, cell-cell and cell-matrix interactions (Capdevila and Belmonte, 1999; Franceschi, 1999; Osterfield *et al.*, 2003). Dental epithelial histo-morphogenesis is accompanied by changes 1) in the composition of the basement membrane (BM) (Yoshida *et al.*, 1998; Nagai *et al.*, 2001), partially regulated by matrix metalloproteinases and their inhibitors (Yoshida *et al.*, 2003), 2) in the location of signal molecules in the epithelium and mesenchyme (Nadiri *et al.*, 2004), and 3) in the expression of cell-surfaces molecules including integrins (Salmivirta *et al.*, 1996; Lesot *et al.*, 2002), receptors for signaling molecules (Ohazama *et al.*, 2004; Fried *et al.*, 2002) and cadherins (Obara and Lesot, 2004).

Cultured reassociations between isolated dental mesenchyme and enamel organ showed that the cap stage mesenchyme controls the crown morphogenesis (Kollar and Baird, 1970; Schmitt *et al.*, 1999). The goals of this study were 1) to determine whether the dental mesenchyme at ED14 can control the dental epithelial histogenesis; 2) to test the role of the PEK in specifying the potentialities of the dental mesenchyme, and 3) to analyze whether positional information of dental epithelial cells is memorized. For this purpose, first lower molars from mouse embryos were dissociated by trypsin treatment in order to separate the

mesenchyme from the epithelium, and the epithelium was further dissociated to get isolated cells. These cells were reassociated with a dental mesenchyme and cultured *in vitro* up to 14 days. Tooth germs were taken at the cap stage, embryonic day (ED) 14 when the PEK is present and functional, and at the bud stage (ED13), when the PEK is just forming.

## **MATERIAL & METHODS**

### **Tissue preparation**

ICR female mice were mated overnight and the detection of the vaginal plug was considered as Embryonic Day 0 (ED0). The embryos were harvested at ED13 and ED14 and the first lower molars were isolated under a stereomicroscope (Leica MZ9). The dental epithelium and mesenchyme were dissociated from ED13 (n = 640) and ED14 (n = 1920) first lower molars by using 1% trypsin in Hanks' at 4°C (Schmitt *et al.*, 1999). After tissue separation, the dental epitheliums were further dissociated into single cells (see Appendix 1) and filtrated through 70µm nylon filter. The quality of the tissue and cell dissociation was checked by histology, scanning electron microscopy and inversed microscope (see Appendix 1). After a centrifugation at 9, 000g for 2 minutes, the pellet of epithelial cells was cut into fragments, reassociated with dental mesenchymes and co-cultured. One mesenchyme was recombined respectively with  $13 \pm 1 \times 10^3$  epithelial cells at ED14 and  $9.1 \pm 0.9 \times 10^3$  cells at ED13. Cells were counted in a Malassez hemocytometer after staining with trypan blue. These cell countings were treated with a statistical program Sigmastat (SPSS Inc.). The experimental protocol was designed in compliance with the recommendation of the European Economic Community (86/609/CEE) for the care and use of laboratory animals.

## **Cultures**

The reassociations were cultured from 12 hours up to 14 days on a semi-solid medium, which consisted of DMEM/F-12 (Gibco) containing 20% fetal bovine serum (CAMBREX), and supplemented with ascorbic acid (0,18mg/ml, Merck), L-Glutamine (2mM, Gibco), penicilline/streptomycine (50 units/ml, Gibco) and agar (0,36%, Sigma). Cultures were incubated at 37°C in a humidified atmosphere of 5% CO<sub>2</sub>. The medium was changed every two days. In this work, 382 reassociations were performed at ED14 and 83 at ED13.

## **Histology**

All samples were fixed in Bouin-Hollande, embedded in paraffin, and serial sections (5µm) were stained with Mallory.

## **BrdU Incorporation**

Cell proliferation was investigated by mapping the distribution of S-phase cells after incorporation of 5-bromo-2-deoxy-uridine (BrdU, cell proliferation kit; Amersham Life Science) (Coin *et al.*, 1999). The samples were fixed in Bouin-Hollande, embedded in paraffin and sectioned. After immunodetection of BrdU, the serial sections were counterstained with eosin.

## **Immunostaining for apoptosis**

Apoptosis were detected on frozen sections (7 µm) using a rabbit polyclonal anti-ssDNA antibody (1:250, Dako). The primary antibody was visualized by using the detection kit from Vector Laboratories. The staining with a biotinylated anti-rabbit secondary antibody was visualized with avidin coupled to horseradish peroxidase. The color reaction was achieved with DAB substrate. The sections were counterstained with nuclear fast red or 25% hematoxylin.

### **In situ hybridization**

The *Shh* cDNA (a 642-bp mouse cDNA, a gift from Prof. Andrew McMahon, Harvard University, Boston) was used as templates to make digoxigenin-labeled RNA probe (Echelard *et al.*, 1993). In situ hybridization was performed on 7 $\mu$ m frozen sections.

### **3D reconstructions**

The contours of the epithelium were represented from serial histological sections using a Leica (DMRB) microscope equipped with a drawing chamber. The drawings were digitalized using a Hamamatsu C2400 camera connected to a digital imaging system as previously been described (Lesot *et al.*, 1996).

## **RESULTS**

### **Cultured ED14 Reassociations**

After 12 hours, the epithelial-mesenchymal junction was restored (Figs. 1A, F) in 8/8 reassociations. All the epithelial cells showed a similar size and round shape. Necrosis and apoptosis were still frequent (Fig. 1F).

Most of the necrosis and apoptosis disappeared after 24 hours (32/32 samples) (see Appendix 2). The epithelium organized as a bud with two cell populations (Figs. 1B, G). The internal cells remained small and round while cells in contact with the BM became larger and started to elongate (Fig. 1G).

After 2 days culture, the epithelium reached the early cap stage (Fig. 1C). The cells of the ODE organized as a single layer. They were much shorter than the prospective IDE cells. A group of cells condensed in the central part of the IDE, with the same organization as cells of the PEK *in vivo*: small and non-dividing cells with many apoptosis (Figs. 1H)

After 3 days, the reassociations reached a very transient cap stage (Fig. 1D). The epithelial histogenesis had progressed: the stellate reticulum was better seen between the IDE or the PEK and the ODE (Fig. 1I). The PEK was still visible in 31 of 47 samples. After BrdU incorporation, most of the cells of the PEK in the reassociation were BrdU-negative (Fig. 1P) as in the tooth germ at E14 (Fig. 1K). *In situ* hybridization for *Shh* (Fig. 1R) showed that the *Shh*-positive and BrdU-negative PEK cells had already started to segregate (Coin *et al.*, 1999). In reassociations cultured for 3 days, apoptosis were detected in the internal cells of what remained from the PEK (Fig. 1Q), as also observed in tooth germs at ED14 (Fig. 1L).

After 6 days, cusp formation was more prominent and the stratum intermedium (SI) was visible (Figs. 1E, J) in all 44 samples. The mesenchymal cells in contact with the BM were still preodontoblasts (Fig. 1J). The cells from the odontoblast layer started to polarize only after 8 days (22/22 samples, not shown) and after 10 days they became secretory odontoblasts (22/22 samples, not shown). Gradients of predentin/dentin secretion were initiated at the tip of the cusps and progressed towards the cervical loop. The cytodifferentiation of odontoblasts and ameloblasts (Figs. 1N, O, S) was illustrated after 14 days in culture (9/9 samples). At this stage, the shape of the cultured reassociation was examined with 3D reconstruction, illustrating the formation of six cusps (Fig. 1T), very close from the seven cusps observed in the first lower molar.

### **Cultured ED13 Reassociations**

After 12 hours, the epithelial-mesenchymal junction was restored in 8 of 8 samples. However, all the epithelial cells showed the same size (Fig. 2A). After 24 hours (10/10 samples), the epithelial cells organized as a bud (Fig. 2B) and began to differentiate into two groups: round cells in the center and elongated cells in contact with the BM (Fig. 2B). The condensation of the dental mesenchyme increased from 12 hours to 24 hours (compare Fig. 2A

with Fig. 2B). After 2 days, 10 of 12 samples had reached the cap stage (Fig. 2C). A PEK-like structure was observed in 9 of 12 samples and the epithelial histogenesis progressed with the appearance of the stellate reticulum (SR). After 3 days culture, the existence of PEK was also confirmed by BrdU incorporation and *in situ* hybridization for *Shh* (not shown). After 4 days in culture (13/13 samples), the cervical loop developed and the volume of SR increased (Fig. 2D). After 6 days, the cervical loop still elongated and cusps were apparent in all (11 samples) reassociations (Fig. 2E). At this stage, all epithelial compartments (IDE, ODE, SR and SI) were distinct. Odontoblasts became functional after 10 days (9/9 samples, not shown) and ameloblasts differentiated after 12 days (8/8 samples, not shown). After 14 days, polarized ameloblasts were functional and the crown was well formed (Fig. 2F).

## DISCUSSION

The strict regulation of crown morphogenesis involves reciprocal epithelial-mesenchymal interactions. Tissue reassociation experiments have shown that it is controlled by the cap stage mesenchyme (Kollar and Baird, 1970; Schmitt *et al.*, 1999). The purpose of this work was to determine whether the mesenchyme can also control the dental epithelial histogenesis after all epithelial cells organization has been lost by cell dissociation (Fig. 3).

An important cell death (See Appendix 2) and the restoration of the epithelial-mesenchymal junction preceded the first sign of epithelial histogenesis in the reassociation. Trypsin dissociation altered the cell surfaces, especially the membrane receptors and adhesive molecules, two systems involved in signaling (Obara and Lesot, 2004; Tucker *et al.*, 2004). All the pre-existing positional information for the different epithelial cells groups present at the cap stage was lost but clearly started to be re-established after 24 hours when the internal/external cell compartments began to restore. Cell-cell and cell matrix interactions are involved in this specification (Edwards and Streuli, 1995).

After two days in culture, a new step was achieved in epithelial histogenesis with the transient appearance of a condensed group of cells in the IDE, similar to the PEK. *In vivo*, the PEK consists in non-dividing cells, which express signaling molecules suggested to be involved in the control of crown morphogenesis (for review, see Thesleff and Sharpe, 1997). In the reassociations, the group of condensed non-dividing cells, as checked after BrdU incorporation, expressed *Shh* and *Fgf-4* (not shown). Cusp formation, initiated after 4 days, showed that even after epithelial cell dissociation the dental mesenchyme can control the restoration of a functional PEK as well as the geometry of the segregation of the non-cycling PEK cells in contact with the BM (Coin *et al.*, 1999). The cap stage mesenchyme thus can instruct dental epithelial histogenesis.

To check whether the PEK is involved in specifying the potentialities of the dental mesenchyme, experiments were performed using tooth germs at ED13. The epithelium was still at the bud stage and the precursor of the PEK was just starting to appear. Epithelial histogenesis and general morphogenesis progressed similarly in reassociations made with material from ED13 or ED14. The mesenchyme at ED13 induced the formation of a new PEK and cusp formation was followed by odontoblasts and ameloblasts differentiation. The initial potentialities of the mesenchyme are thus not specified by the PEK.

During odontogenesis, the epithelial histo-morphogenesis results from differential cell proliferation, apoptosis, and cell migration. The coordination of these cellular activities probably requires positional information, specified by cell-matrix and cell-cell interactions as well as by gradients of morphogens (Capdevila and Belmonte, 1999; Franceschi, 1999; Tabata and Takei, 2004). When the epithelial cells were dissociated from cap stage enamel organs (ED14), the IDE, ODE, SR and PEK were already distinct (Fig. 3). The BM also showed a different composition when in contact with the IDE or ODE (Yoshida *et al.*, 1998; Nagai *et al.*, 2001). The trypsin dissociation led to the hydrolysis of the BM and also affected the

extracellular matrix in the mesenchyme and cell surfaces in both the epithelium and mesenchyme (Lesot *et al.*, 1981; Osman and Ruch, 1981). After trypsin dissociation, single epithelial cells from 60 teeth were mixed, filtrated, pelleted and reassociated with dental mesenchymes. Despite the mixture of different cell populations and complete loss of positional information (Fig. 3), a newly formed continuous BM was deposited after 12 hours at the junction between the mesenchyme and epithelial cells. As a consequence of their new position, epithelial cells were reprogrammed to adapt to their immediate environment (i.e. in contact or not with a mesenchyme), which conditioned their shape.

After 4 days in culture, the IDE and ODE differentiated in the reassociations as it occurs *in vivo*. This is also controlled by the dental mesenchyme (Olive and Ruch, 1982). Since the dental and peridental mesenchymes *in vivo* show differences in immunostaining for BMP-2 and BMP-4 (Nadiri *et al.*, 2004), functional differences may be expected in the two areas. Furthermore, the regional changes in the BM composition during the bud to cap transition, depending on whether it is in contact with the IDE or ODE, might results from combined effects of MMPs and TIMPs (Yoshida *et al.*, 2003). These local changes in the BM might be involved in a differential signaling through integrins (Tsuruta *et al.*, 2003). Positional identity was suggested to be based on short-range information and also to be interpreted by cells in terms of their developmental history (Wolpert, 2003). The fate of the reassociations suggests that epithelial histogenesis of the enamel organ does not require any long-term memory (Hu *et al.*, in press).

In conclusion, these experiments confirmed the role of the cap-staged mesenchyme in the control to tooth morphogenesis. They further demonstrated that the mesenchyme can induce disorganized epithelial cells to restore a complete histogenesis of the enamel organ. Initially, the potentialities of the mesenchyme are not specified by the PEK. In this system, the positional information does not require memorization of cell history as seen when using epithelial cells

from E14. This epithelial cell plasticity (i.e. their ability to undergo conversion between different epithelial cell types) is a prerequisite for enamel tissue engineering.

**ACKNOWLEDGMENTS:** The authors thank A. Ackerman for his assistance in histology. Besides financial support from the INSERM, this work was also partially financed by the Institut Français pour la Recherche Odontologique (2003), the National Natural Science Foundation of China (Grants No. 30125042 and 30170254), Beijing Health Science Key Grant (1999-04) and a Frontier Research Project H15 on Tooth Morphogenesis (2003-2007) from the Japanese ESSCT Ministry.

## REFERENCES

- Capdevila J, Belmonte JC (1999). Extracellular modulation of the Hedgehog, Wnt and TGF-beta signalling pathways during embryonic development. *Curr Opin Genet Dev* 9:427-433.
- Coin R, Lesot H, Vonesch JL, Haikel Y, Ruch JV (1999). Aspects of cell proliferation kinetics of the inner dental epithelium during mouse molar and incisor morphogenesis: a reappraisal of the role of the enamel knot area. *Int J Dev Biol* 43:261-267.
- Duailibi MT, Duailibi SE, Young CS, Bartlett JD, Vacanti JP, Yelick PC (2004). Bioengineered teeth from cultured rat tooth bud cells. *J Dent Res* 83:523-528. Comment in: *J Dent Res* 83:517.
- Echelard Y, Epstein DJ, St-Jacques B, Shen L, Mohler J, McMahon JA, *et al.* (1993). Sonic hedgehog, a member of a family of putative signaling molecules, is implicated in the regulation of CNS polarity. *Cell* 75:1417-1430.
- Edwards G, Streuli C (1995). Signalling in extracellular-matrix-mediated control of epithelial cell phenotype. *Biochem Soc Trans* 23:464-468.

- Franceschi RT (1999). The developmental control of osteoblast-specific gene expression: role of specific transcription factors and the extracellular matrix environment. *Crit Rev Oral Biol Med* 10:40-57.
- Fried K, Risling M, Tidcombe H, Gassmann M, Lillesaar C (2002). Expression of ErbB3, ErbB4, and neuregulin-1 mRNA during tooth development. *Dev Dyn* 224:356-360.
- Hu B, Nadiri A, Bopp-Kuchler S, Perrin-Schmitt F, Wang S, Lesot H (2004). Dental epithelial histo-morphogenesis in the mouse: positional information versus cell history. *Arch Oral Biol* in press.
- Kollar EJ, Baird GR (1970). Tissue interactions in embryonic mouse tooth germs. II. The inductive role of the dental papilla. *J Embryol Exp Morphol* 24:173-186.
- Lesot H, Kieffer-Combeau S, Fausser JL, Meyer JM, Perrin-Schmitt F, Peterkova R, *et al.* (2002). Cell-cell and cell-matrix interactions during initial enamel organ histomorphogenesis in the mouse. *Connect Tissue Res* 43:191-200.
- Lesot H, Osman M, Ruch JV (1981). Immunofluorescent localization of collagens, fibronectin, and laminin during terminal differentiation of odontoblasts. *Dev Biol* 82:371-381.
- Lesot H, Vonesch JL, Peterka M, Tureckova J, Peterkova R, Ruch JV (1996). Mouse molar morphogenesis revisited by three dimensional reconstruction. II Spatial distribution of mitoses and apoptosis in cap to bell staged first and second upper molar teeth. *Int J Dev Biol* 40:1017-1031.
- Nadiri A, Kuchler-Bopp S, Haïkel Y, Lesot H (2004). Immunolocalization of BMP-2/-4, FGF-4 and WNT10b in the developing mouse first lower molar. *J Histochem Cytochem* 52:103-112.
- Nagai N, Nakano K, Sado Y, Naito I, Gunduz M, Tsujigiwa H, *et al.* (2001). Localization of type IV collagen  $\alpha 1$  to  $\alpha 6$  chains in basement membrane during mouse molar germ development. *Int J Dev Biol* 45:827-831.

- Obara N, Lesot H (2004). Subcellular localization of  $\beta$ -catenin and cadherin expression in the cap stage enamel organ of the mouse molar. *Histochem Cell Biol* 121:351-358.
- Ohazama A, Courtney JM, Tucker AS, Naito A, Tanaka S, Inoue J, *et al.* (2004). Traf6 is essential for murine tooth cusp morphogenesis. *Dev Dyn* 229:131-135.
- Ohazama A, Modino SA, Miletich I, Sharpe PT (2004). Stem-cell-based tissue engineering of murine teeth. *J Dent Res*. 83:518-522. Comment in: *J Dent Res* 83:517.
- Olive M, Ruch JV (1982). Does the basement membrane control the mitotic activity of the inner dental epithelium of the embryonic mouse first lower molar? *Dev Biol* 93:301-307.
- Osman M, Ruch JV (1981). Behavior of odontoblasts and basal lamina of trypsin or EDTA-isolated mouse dental papillae in short-term culture. *J Dent Res* 60:1015-1027.
- Osterfield M, Kirschner MW, Flanagan JG (2003). Graded positional information: interpretation for both fate and guidance. *Cell* 113:425-428.
- Salmivirta K, Gullberg D, Hirsch E, Altruda F, Ekblom P (1996). Integrin subunit expression associated with epithelial-mesenchymal interactions during murine tooth development. *Dev Dyn* 205:104-113.
- Schmitt R, Lesot H, Vonesch JL, Ruch JV (1999). Mouse odontogenesis in vitro: the cap-stage mesenchyme controls individual molar crown morphogenesis. *Int J Dev Biol* 43:255-260.
- Tabata T, Takei Y (2004). Morphogens, their identification and regulation. *Development* 131:703-712.
- Thesleff I, Sharpe P (1997). Signalling networks regulating dental development. *Mech Dev* 67:111-123.
- Tsuruta D, Hopkinson SB, Lane KD, Werner ME, Cryns VL, Jones JC (2003). Crucial role of the specificity-determining loop of the integrin beta4 subunit in the binding of cells to laminin-5 and outside-in signal transduction. *J Biol Chem* 278:38707-38714.

- Tucker AS, Headon DJ, Courtney JM, Overbeek P, Sharpe PT (2004). The activation level of the TNF family receptor, Edar, determines cusp number and tooth number during tooth development. *Dev Biol* 268:185-194.
- Wolpert L (2003). Cell boundaries: knowing who to mix with and what to shout or whisper. *Development* 130:4497-4500.
- Yoshida K, Yoshida N, Aberdam D, Meneguzzi G, Perrin-Schmitt F, Stoetzel C, *et al.* (1998). Expression and localization of laminin-5 subunits during mouse tooth development. *Dev Dyn* 211:164-176.
- Yoshida N, Yoshida K, Stoetzel C, Perrin-Schmitt F, Cam Y, Ruch JV, *et al.* (2003). Temporo-spatial gene expression and protein localization of matrix metalloproteinases and their inhibitors during mouse molar tooth development. *Dev Dyn* 228:105-112.

## FIGURE LEGENDS

**Fig. 1** *In vitro* development of reassociations between dental mesenchymes and dissociated epithelial cells from first lower molars at ED14. The reassociations were cultured for 12 hours (A, F), 24 hours (B, G), 2 days (C, H), 3 days (D, I, P, Q, R), 6 days (E, J) and 14 days (N, O, S, T).

To visualize cell proliferation, ED14 first lower molars were cultured for 18 hours in the presence of BrdU (K) and reassociations were cultured for 54 hours *in vitro* and 18 hours in the presence of BrdU (P). Apoptosis were visualized after staining for ssDNA on ED14 molar (L, arrow) and reassociation cultured for 3 days (Q, arrow). *In situ* hybridization for *Shh* was performed on first lower molar at ED14 (M) and reassociations cultured for 3 days (R).

After 14 days in culture, odontoblasts were functional and ameloblasts polarized (N, O, S). Six cusps were observed as seen on histological horizontal section (O) or after 3D reconstruction of the mesenchyme (T).

AM: ameloblast; BM: basement membrane; D: dentin; DE: dental epithelium; DM: dental mesenchyme; DP: dental papilla; IDE: inner dental epithelium; OD: odontoblast; ODE: outer dental epithelium; PEK: primary enamel knot; SEK: secondary enamel knot; SI: stratum intermedium; SR: stellate reticulum. Bar = 40  $\mu$ m.

**Fig. 2** *In vitro* development of reassociations between dental mesenchymes and dissociated epithelial cells from first lower molars at ED13. The reassociations were cultured for 12 hours (A), 24 hours (B), 2 days (C), 4 days (D), 6 days (E), and 14 days (F). DE: dental epithelium; DM: dental mesenchyme; DP: dental papilla. Bar = 40  $\mu$ m.

**Fig. 3** Scheme of the dissociation-reassociation experiments: 1. About 60 tooth germs at the cap stage were dissociated by trypsin treatment in order to separate the dental mesenchymes from the dental epitheliums (1). The epitheliums were further dissociated into single cells (2). After filtration and centrifugation, the pellet containing mixed epithelial cells from four origins (SR, IDE, ODE, PEK) was fragmented and reassociated with dental mesenchymes (3). These reassociations were cultured for 3 days to reach the cap stage and show the restoration of epithelial histogenesis (4).

## **Appendix 1: Quality of the dissociations**

Mouse first lower molar at ED14 (A), dissociated epithelium (B, E), mesenchyme (C, F) and epithelial cells (D). The molar and the dissociated tissues were stained with Mallory (A-C). The absence of contamination of each tissue by the other was checked by histology (B, C) and scanning electron microscopy (E, F). The dissociation of epithelial cells was verified using an inverted microscope (D). Bar = 40  $\mu\text{m}$ .

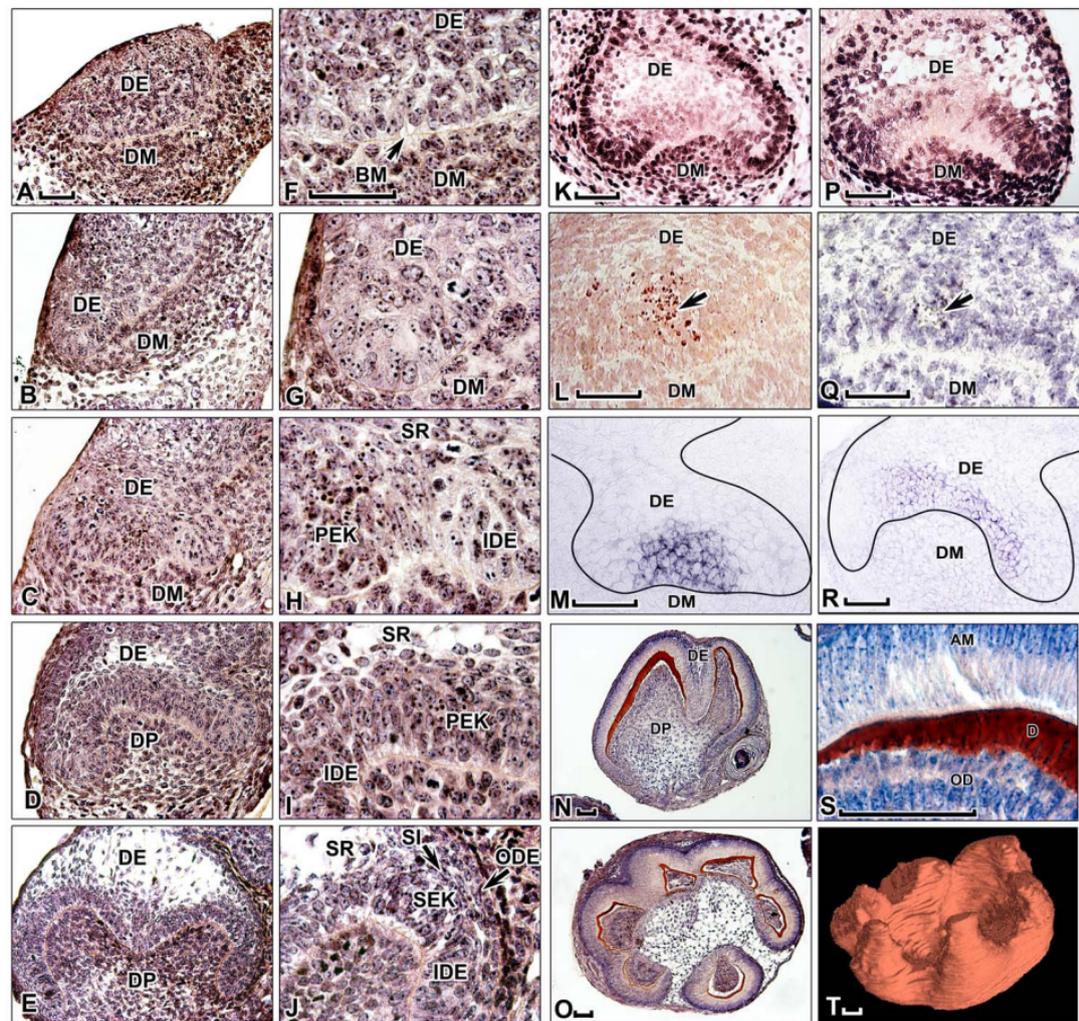
For scanning electron microscopy, the samples were fixed with 2.5% glutaraldehyde in cacodylate buffer (75mM sodium cacodylate pH 7.3, 4.5% sucrose, 1mM  $\text{MgCl}_2$  and 1mM  $\text{CaCl}_2$ ) before being dried with hexamethyldisilazane, mounted on aluminium stubs with Leit-C carbon cement (Electron Microscopy Sciences, Fort Washington, PA, USA) and sputter-coated with gold-palladium in a Balzers coating device (Bal-Tec, Balzers, Lichtenstein). The samples were examined in a Hitachi S-800 scanning electron microscope (Hitachi, Tokyo, Japan).

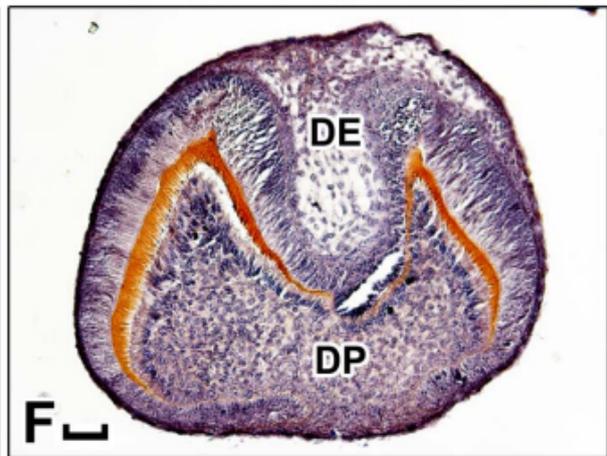
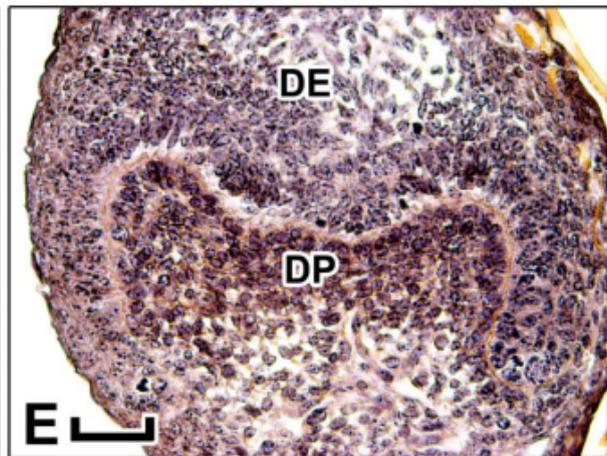
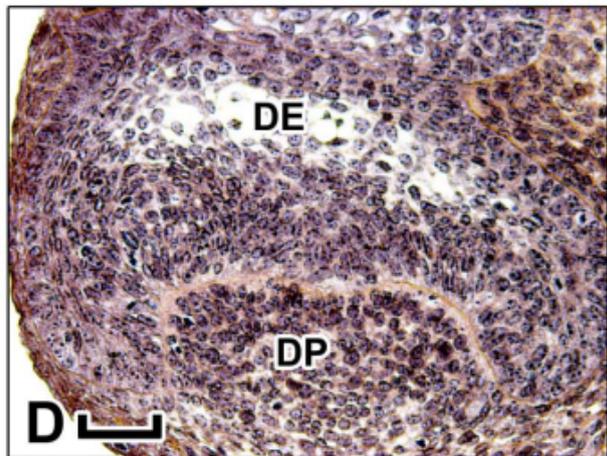
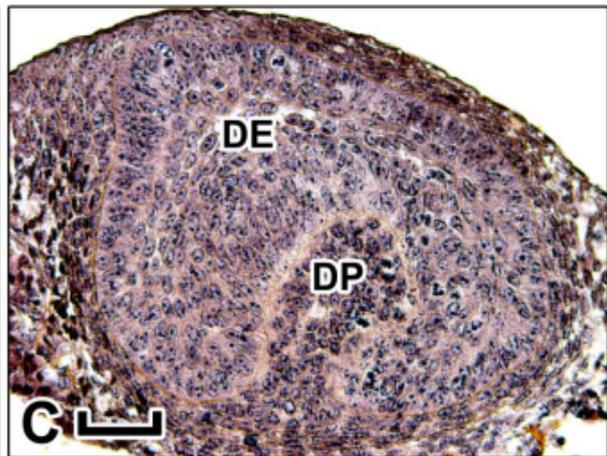
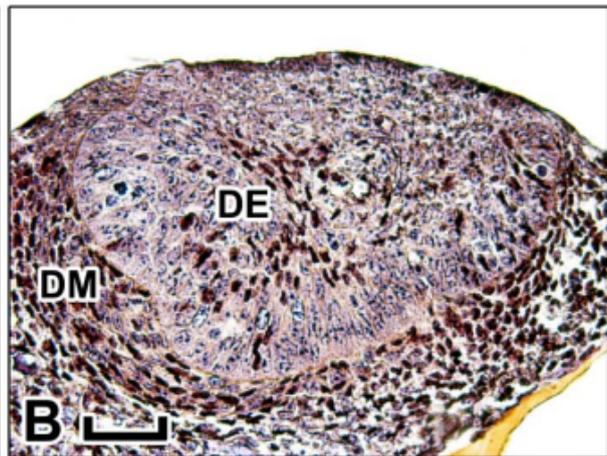
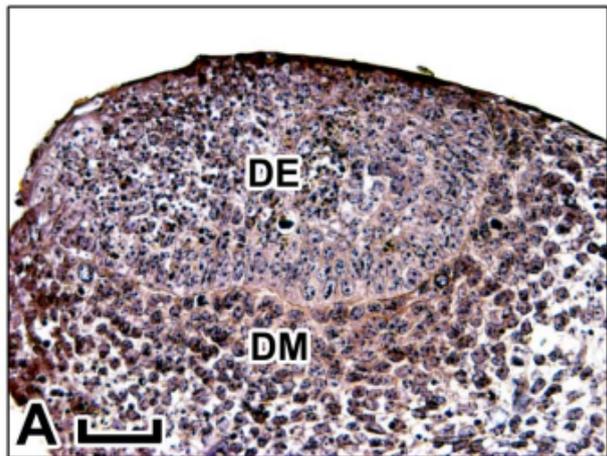
## **Appendix 2: Initial Cell Death**

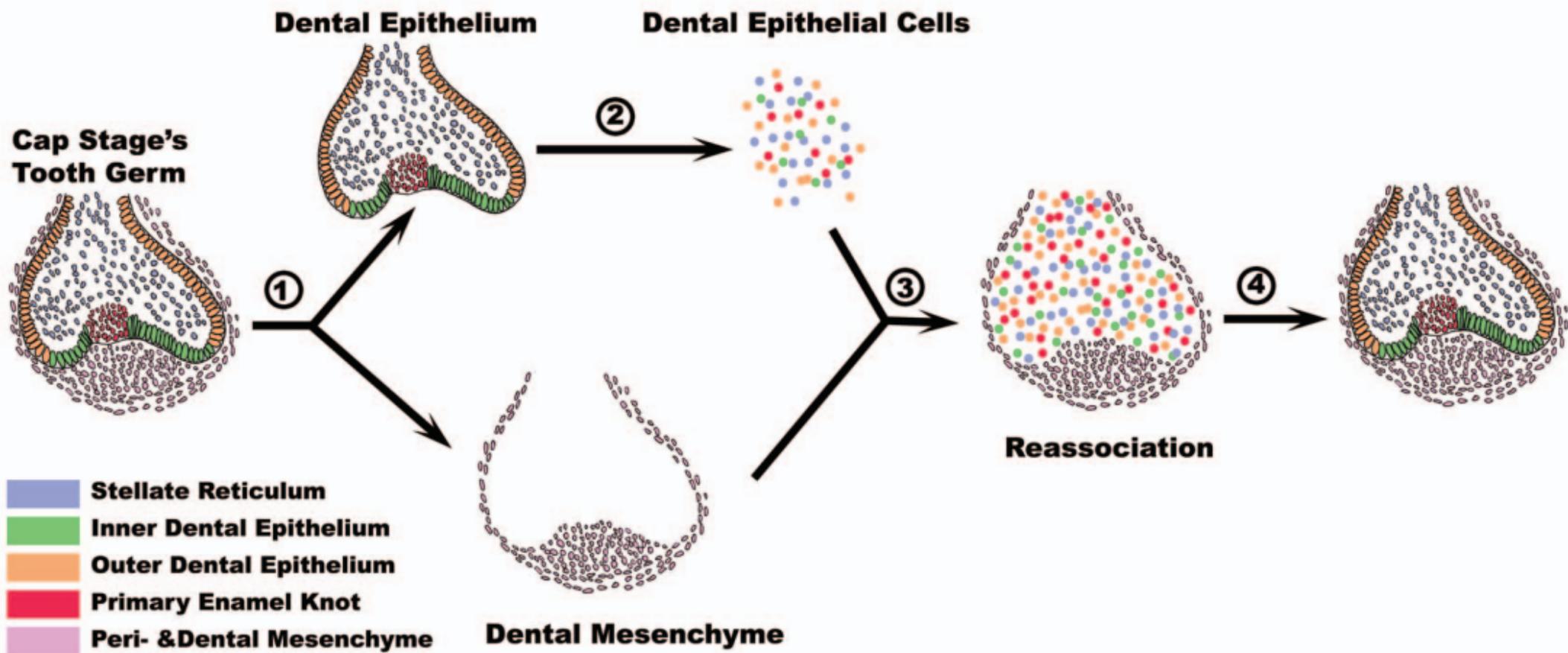
Cell-death occurred in cultured reassociations during the first 12 hours and the clearance of apoptosis/necrosis became visible after 24 hours. Necrosis was a consequence of all preliminary treatments, tissue harvesting and trypsin dissociation (Emgard *et al.*, 2002). Apoptosis plays important roles during tooth development (Peterkova *et al.*, 2003; Matalova *et al.*, 2004) and as such it took place with its specific patterning at different steps during the culture of the reassociations. However, it could initially be increased as a consequence of the loss of the basement membrane, which has protective effects (Tang *et al.*, 1999; Prince *et al.*, 2002). After 24 hours, the dead cells had been cleared. The epithelium organized as a bud and the epithelial cells in contact with the basement membrane started to elongate while the internal cells remained small and round, mimicking the *in vivo* situation at the bud stage (Obara *et al.*, 1998).

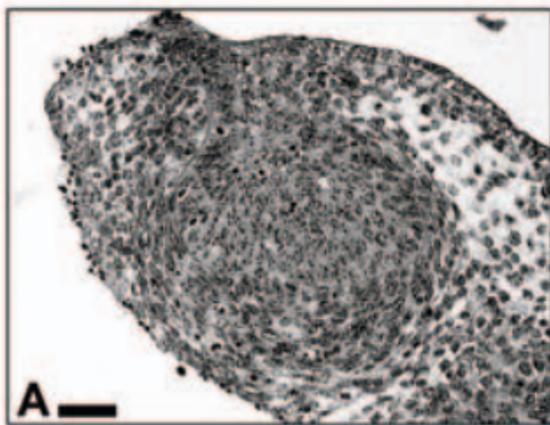
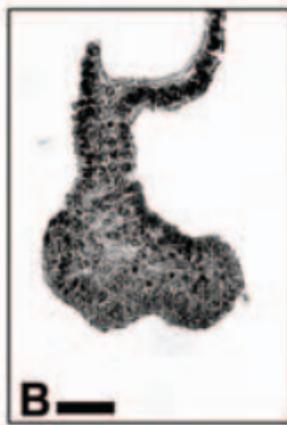
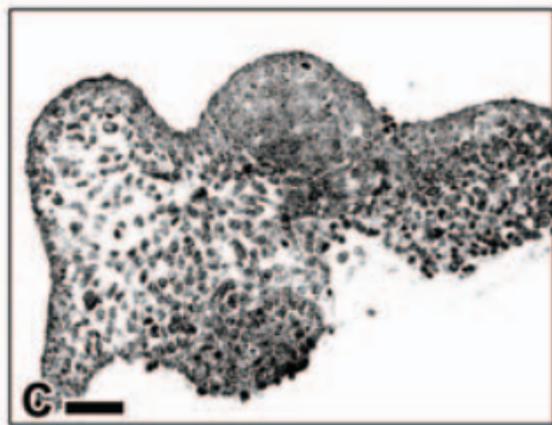
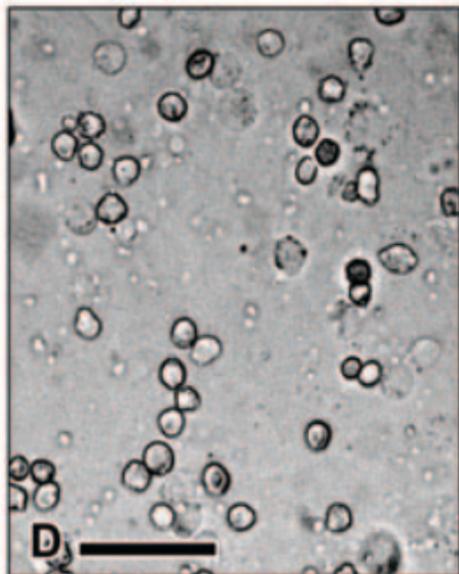
**References cited in appendix:**

- Emgard M, Blomgren K, Brundin P (2002). Characterisation of cell damage and death in embryonic mesencephalic tissue: a study on ultrastructure, vital stains and protease activity. *Neuroscience* 115:1177-1187.
- Matalova E, Tucker AS, Sharpe PT (2004). Death in the life of a tooth. *J Dent Res* 83:11-16.
- Obara N, Suzuki Y, Nagai Y, Takeda M. 1998. Expression of E- and P-cadherin during tooth morphogenesis and cytodifferentiation of ameloblasts. *Anat Embryol (Berl)* 197:469-475.
- Peterkova R, Peterka M, Lesot H (2003). The developing mouse dentition: a new tool for apoptosis study. *Ann N Y Acad Sci* 1010:453-466.
- Prince JM, Klinowska TC, Marshman E, Lowe ET, Mayer U, Miner J, *et al.* (2002). Cell-matrix interactions during development and apoptosis of the mouse mammary gland in vivo. *Dev Dyn* 223:497-516.
- Tang K, Nie D, Cai Y, Honn KV (1999). The beta4 integrin subunit rescues A431 cells from apoptosis through a PI3K/Akt kinase signaling pathway. *Biochem Biophys Res Commun* 264:127-132.







**A****B****C****D****E****F**

## REFERENCES

- Aberg T, Wozney J, Thesleff I** (1997) Expression patterns of bone morphogenetic proteins (Bmps) in the developing mouse tooth suggest roles in morphogenesis and cell differentiation. *Dev Dyn* 210: 383-396.
- Adams et Watt** (1993) Regulation of development and differentiation by the extracellular matrix. *Development*. 117:1183-1198.
- Ahmad N, Ruch JV** (1987) Comparison of growth and cell proliferation kinetics during mouse molar odontogenesis in vivo and in vitro. *Cell Tissue Kinet* 20:319-329.
- Allen BL, Fill MS, Rapraeger AC** (2001) Role of heparan sulfate as a tissue-specific regulator of FGF-4 and FGF receptor recognition. *J Cell Biol* 155: 845-858.
- Alonso L, Fuchs E** (2003) Stem cells of the skin epithelium. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1:11830-11835.
- Andl T, Reddy ST, Gaddapara T, Millar SE** (2002) WNT signals are required for the initiation of hair follicle development. *Dev Cell* 25:876-882.
- Andl T, Ahn K, Kairo A, Chu EY, Wine-Lee L, Reddy ST, Croft NJ, Cebra-Thomas JA, Metzger D, Chambon P, Lyons KM, Mishina Y, Seykora JT, Crenshaw EB 3rd, Millar SE** (2004) Epithelial *Bmpr1a* regulates differentiation and proliferation in postnatal hair follicles and is essential for tooth development. *Development* 131:2257-2268.
- Aviezer D, Safran M, Yayon A** (1999) Heparin differentially regulates the interaction of fibroblast growth factor-4 with FGF receptors 1 and 2. *Biochem Biophys Res Commun* 263: 621-626.
- Baeg GH, Lin X, Khare N, Baumgartner S, Perrimon N** (2001) Heparan sulfate proteoglycans are critical for the organization of the extracellular distribution of Wingless. *Development* 128: 87-94.
- Bai XM, Van der Schueren B, Cassiman JJ, Van den Berghe H, David G** (1994) Differential expression of multiple cell-surface heparan sulfate proteoglycans during embryonic tooth development. *J Histochem Cytochem* 42:1043-1054.
- Barlow AJ, Bogardi JP, Ladher R, Francis-West PH** (1999) Expression of chick *Barx-1* and its differential regulation by FGF-8 and BMP signaling in the maxillary primordia. *Dev Dyn*. 214:291-302.

- Begue-Kirn C, Smith AJ, Ruch JV, Wozney JM, Purchio A, Hartmann D, Lesot H** (1992) Effects of dentin proteins, transforming growth factor beta1 (TGF beta1) and bone morphogenetic protein 2 (BMP2) on the differentiation of odontoblast in vitro. *Int J Dev Biol* 36: 491-503.
- Begue-Kirn C, Smith AJ, Loriot M, Kupferle C, Ruch JV, Lesot H** (1994) Comparative analysis of TGF beta s, BMPs, IGF1, msxs, fibronectin, osteonectin and bone sialoprotein gene expression during normal and in vitro-induced odontoblast differentiation. *Int J Dev Biol* 38: 405-420.
- Bei M, Maas R** (1998) FGFs and BMP4 induce both Msx1-independent and Msx1-dependent signaling pathways in early tooth development. *Development* 125: 4325-4333.
- Buckland RA, Collinson JM, Graham E, Davidson DR, Hill RE.** (1998) Antagonistic effects of FGF4 on BMP induction of apoptosis and chondrogenesis in the chick limb bud. *Mech Dev* 71:143-50.
- Bhanot P, Brink M, Samos CH, Hsieh JC, Wang Y, Macke JP, Andrew D, Nathans J, Nusse R.** (1996 )A new member of the frizzled family from Drosophila functions as a Wingless receptor. *Nature* 382:225-30.
- Cam Y, Neumann MR, Ruch JV** (1990) Immunolocalization of transforming growth factor beta 1 and epidermal growth factor receptor epitopes in mouse incisors and molars with a demonstration of in vitro production of transforming activity. *Arch Oral Biol* 35:813-822.
- Cam Y, Lesot H, Colosetti P, Ruch JV** (1997) Distribution of transforming growth factor beta1-binding proteins and low-affinity receptors during odontoblast differentiation in the mouse. *Arch Oral Biol* 42: 385-391.
- Canalis E, Economides AN, Gazzerro E** (2003) Bone morphogenetic proteins, their antagonists, and the skeleton. *Endocr Rev* 24:218-235.
- Cerny R, Slaby I, Hammarstrom L, Wurtz T.** (1996) A novel gene expressed in rat ameloblasts codes for proteins with cell binding domains. *J Bone Miner Res* 11:883-891.
- Chen Y, Zhao X.** (1998) Shaping limbs by apoptosis. *J Exp Zool* 282:691-702.
- Chiang C, Litingtung Y, Lee E, Young KE, Corden JL, Westphal H, Beachy PA** (1996) Cyclopia and defective axial patterning in mice lacking Sonic hedgehog gene function. *Nature* 383:407-413.
- Chiquet-Ehrismann** (1990) What distinguishes tenascin from fibronectin? *FASEB J* 4:2598-2604.
- Christian JL** (2000) BMP, Wnt and Hedgehog signals: how far can they go? *Curr Opin Cell Biol* 12: 244-249.

- Ciruna B, Rossant J** (2001) FGF signaling regulates mesoderm cell fate specification and morphogenetic movement at the primitive streak. *Dev Cell* 1:37-49.
- Coin R, Haikel Y, Ruch JV** (1999a) Effects of apatite, transforming growth factor beta-1, bone morphogenetic protein-2 and interleukin-7 on ameloblast differentiation in vitro. *Eur J Oral Sci* 107: 487-495.
- Coin R, Lesot H, Vonesch JL, Haikel Y, Ruch JV** (1999b) Aspects of cell proliferation kinetics of the inner dental epithelium during mouse molar and incisor morphogenesis: a reappraisal of the role of the enamel knot area. *Int J Dev Biol* 43: 261-267.
- Coin R, Kieffer S, Lesot H, Vonesch JL, Ruch JV.** (2000) Inhibition of apoptosis in the primary enamel knot does not affect specific tooth crown morphogenesis in the mouse. *Int J Dev Biol* 44:389-396.
- Coles HS, Burne JF, Raff MC.** (1993) Large-scale normal cell death in the developing rat kidney and its reduction by epidermal growth factor. *Development* 118:777-784.
- Collins MK, Perkins GR, Rodriguez-Tarduchy G, Nieto MA, Lopez-Rivas A** (1994) Growth factors as survival factors: regulation of apoptosis. *Bioessays* 16:133-138.
- Dassule HR, McMahon AP** (1998) Analysis of epithelial-mesenchymal interactions in the initial morphogenesis of the mammalian tooth. *Dev Biol* 202: 215-227.
- de Caestecker M** (2004) The transforming growth factor-beta superfamily of receptors. *Cytokine Growth Factor Rev* 15:1-11
- Dewulf N, Verschueren K, Lonnoy O, Moren A, Grimsby S, Vande Spiegle K, Miyazono K, Huylebroeck D, Ten Dijke P** (1995) Distinct spatial and temporal expression patterns of two type I receptors for bone morphogenetic proteins during mouse embryogenesis. *Endocrinology* 136:2652-2663.
- D'Souza RN, Happonen RP, Ritter NM, Butler WT** (1990) Temporal and spatial patterns of transforming growth factor-beta 1 expression in developing rat molars. *Arch Oral Biol* 35:957-965.
- D'Souza RN, Aberg T, Gaikwad J, Cavender A, Owen M, Karsenty G, Thesleff I** (1999) Cbfa1 is required for epithelial-mesenchymal interactions regulating tooth development in mice. *Development* 126:2911-2920.

**Echelard Y, Epstein DJ, St-Jacques B, Shen L, Mohler J, McMahon JA, McMahon AP** (1993) Sonic hedgehog, a member of a family of putative signaling molecules, is implicated in the regulation of CNS polarity. *Cell* 75:1417-1430.

**Erickson HP, Bourdon MA** (1989) Tenascin: an extracellular matrix protein prominent in specialized embryonic tissues and tumors. *Annu Rev Cell Biol* 5:71-92.

**Faham S, Linhardt RJ, Rees DC** (1999). Diversity does make a difference: fibroblast growth factor-heparin interactions. *Curr Opin Struct Biol* 8:578-586.

**Fausser JL, Schlepp O, Aberdam D, Meneguzzi G, Ruch JV, Lesot H** (1998) Localization of antigens associated with adherens junctions, desmosomes, and hemidesmosomes during murine molar morphogenesis. *Differentiation* 63:1-11.

**Ferguson CA, Tucker AS, Christensen L, Lau AL, Matzuk MM, Sharpe PT** (1998) Activin is an essential early mesenchymal signal in tooth development that is required for patterning of the murine dentition. *Genes Dev* 12:2636-2649.

**Fincham AG, Moradian-Oldak J, Simmer JP** (1999) The structural biology of the developing dental enamel matrix. *J Struct Biol* 126:270-299.

**Fishell G** (1999) BMPs: time to murder and create? *Nat Neurosci* 2: 301-303.

**Flaumenhaft R, Moscatelli D, Rifkin DB** (1990). Heparin and heparan sulfate increase the radius of diffusion and action of basic fibroblast growth factor. *J Cell Biol* 111:1651-1659.

**Fong CD, Hammarstrom L, Lundmark C, Wurtz T, Slaby I.** (1996) Expression patterns of RNAs for amelin and amelogenin in developing rat molars and incisors. *Adv Dent Res* 10:195-200.

**Ganan Y, Macias D, Duterque-Coquillaud M, Ros MA, Hurle JM.** (1996) Role of TGF beta s and BMPs as signals controlling the position of the digits and the areas of interdigital cell death in the developing chick limb autopod. *Development* 122:2349-2357.

**Gaunt WA** (1956) The development of enamel and dentine on the molars of the mouse, with an account of the enamel-free areas. *Acta Anat (Basel)* 28:111-134.

**Graham A, Francis-West P, Brickell P, Lumsden A.** (1994) The signalling molecule BMP4 mediates apoptosis in the rhombencephalic neural crest. *Nature* 372:684-686.

- Guha U, Gomes WA, Kobayashi T, Pestell RG, Kessler JA** (2002) In vivo evidence that BMP signaling is necessary for apoptosis in the mouse limb. *Dev Biol* 249:108-120.
- Habas R, Dawid IB, He X** (2003) Coactivation of Rac and Rho by Wnt/Frizzled signaling is required for vertebrate gastrulation. *Genes Dev* 17:295-309.
- Hall BK, Miyake T** (1995) Divide, accumulate, differentiate: cell condensation in skeletal development revisited. *Int J Dev Biol* 39: 881-893.
- Hammerschmidt M, Brook A, McMahon AP** (1997) The world according to hedgehog. *Trends Genet* 13:14-21.
- Hardcastle Z, Mo R, Hui CC, Sharpe PT** (1999) The Shh signalling pathway in tooth development: defects in Gli2 and Gli3 mutants. *Development* 125:2803-2811.
- He X, Semenov M, Tamai K, Zeng X** (2004) LDL receptor-related proteins 5 and 6 in Wnt/beta-catenin signaling: arrows point the way. *Development* 131:1663-1677.
- Hecht A, Kemler R** (2000) Curbing the nuclear activities of beta-catenin. Control over Wnt target gene expression. *EMBO Rep* 1:24-28.
- Heymer J, Ruther U.** (1999) Syndactyly of Ft/+ mice correlates with an imbalance in bmp4 and fgf8 expression. *Mech Dev* 88:173-181.
- Hirning U, Schmid P, Schulz WA, Rettenberger G, Hameister H.**(1991) A comparative analysis of N-myc and c-myc expression and cellular proliferation in mouse organogenesis. *Mech Dev* 33:119-125.
- Hsieh JC** (2004) Specificity of WNT-receptor interactions. *Front Biosci.* 1:1333-1338.
- Hu B, Nadiri A, Bopp-Kuchler S, Perrin-Schmitt F, Wang S, Lesot H** (2005a) Dental epithelial histo-morphogenesis in the mouse: positional information versus cell history. *Arch Oral Biol* 50:131-136.
- Hu B, Nadiri A, Bopp-Kuchler S, Perrin-Schmitt F, Lesot H** (2005b) Dental epithelial histo-morphogenesis *in vitro*. *JDR sous presse*
- Huelsken J, Birchmeier W.** (2001) New aspects of Wnt signaling pathways in higher vertebrates. *Curr Opin Genet Dev* 11:547-553.

- Imai H, Osumi-Yamashita N, Ninomiya Y, Eto K** (1996) Contribution of early-emigrating midbrain crest cells to the dental mesenchyme of mandibular molar teeth in rat embryos. *Dev Biol* 176:151-165.
- Ingham PW, McMahon AP.** (2001) Hedgehog signaling in animal development: paradigms and principles. *Genes Dev* 15:3059-3087.
- Itoh, Sokol** (1994) Heparan sulfate proteoglycans are required for mesoderm formation in *Xenopus* embryos. *Development* 120:2703-2711.
- Jernvall J, Kettunen P, Karavanova I, Martin LB, Thesleff I** (1994) Evidence for the role of the enamel knot as a control center in mammalian tooth cusp formation: non-dividing cells express growth stimulating *Fgf-4* gene. *Int J Dev Biol* 38:463-469.
- Jernvall J, Aberg T, Kettunen P, Keränen S, Thesleff I** (1998) The life history of an embryonic signaling center: BMP-4 induces p21 and is associated with apoptosis in the mouse tooth enamel knot. *Development* 125: 161-169.
- Jernvall J, Thesleff I** (2000) Reiterative signaling and patterning during mammalian tooth morphogenesis. *Mech Dev* 92: 19-29.
- Joseph BK, Savage NW, Young WG, Gupta GS, Breier BH, Waters MJ** (1993) Expression and regulation of insulin-like growth factor-I in the rat incisor. *Growth Factors* 8:267-275.
- Joseph BK, Gobe GC, Savage NW, Young WG** (1994) Expression and localization of sulphated glycoprotein-2 mRNA in the rat incisor tooth ameloblasts: relationships with apoptosis. *Int J Exp Pathol* 75:313-320.
- Joseph BK, Savage NW, Daley TJ, Young WG** (1996) In situ hybridization evidence for a paracrine/autocrine, role for insulin-like growth factor-I in tooth development. *Growth Factor* 13: 11-17.
- Jowett AK, Ferguson MW** (1991) Morphometric analysis of the developing murine molar tooth in vivo and in vitro. *J Anat* 177:135-144.
- Kalderon D** (2000) Transducing the hedgehog signal. *Cell* 103:371-374.
- Karcher-Djuricic V, Osman M, Meyer J.M, Staubli A, Ruch J.V** (1979) Basement membrane reconstitution and cytodifferentiation of odontoblast in isochronal and heterochronal reassociations of enamel organs and pulps. *J. Biol. Buccale* 6: 257-265

- Keranen SV, Aberg T, Kettunen P, Thesleff I, Jernvall J (1998)** Association of developmental regulatory genes with the development of different molar tooth shapes in two species of rodents. *Dev Genes Evol* 208: 477-486.
- Keranen SV, Kettunen P, Aberg T, Thesleff I, Jernvall J (1999)** Gene expression patterns associated with suppression of odontogenesis in mouse and vole diastema regions. *Dev Genes Evol* 209:495-506.
- Karavanova I, Vainio S, Thesleff I. (1992)** Transient and recurrent expression of the Egr-1 gene in epithelial and mesenchymal cells during tooth morphogenesis suggests involvement in tissue interactions and in determination of cell fate. *Mech Dev* 39:41-50.
- Kettunen P, Thesleff I (1998)** Expression and function of FGFs-4, -8, and -9 suggest functional redundancy and repetitive use as epithelial signals during tooth morphogenesis. *Dev Dyn* 211:256-268.
- Kettunen P, Karavanova I, Thesleff I (1999)** Responsiveness of developing dental tissues to fibroblast growth factors: expression of splicing alternatives of FGFR1, -2, -3, and of FGFR4; and stimulation of cell proliferation by FGF-2, -4, -8, and -9. *Dev Genet* 22: 374-385.
- Kettunen P, Laurikkala J, Itaranta P, Vainio S, Itoh N, Thesleff I (2000)** Associations of FGF-3 and FGF-10 with signalling networks regulating tooth morphogenesis. *Dev Dyn* 219: 322-332.
- Kettunen P, Thesleff I (2000)** Expression and function of FGFs-4, -8 and -9 suggest functional redundancy and repetitive use as epithelial signals during tooth morphogenesis. *Dev Dyn* 211: 256-268.
- Kieffer S, Peterkova R, Vonesch JL, Ruch JV, Peterka M, Lesot H (1999)** Morphogenesis of the lower incisor in the mouse from the bud to early bell stage. *Int J Dev Biol* 43:531-539.
- Kikuchi H, Amano H, Yamada S (2001)** Putative role of basement membrane for dentinogenesis in the mesenchyme of murine dental papillae in vitro. *Cell Tissue Res* 303: 93-107.
- Kim IY, Lee DH, Ahn HJ, Tokunaga H, Song W, Devereaux LM, Jin D, Sampath TK, Morton RA (2000)** Expression of bone morphogenetic protein receptors type-IA, -IB and -II correlates with tumor grade in human prostate cancer tissues. *Cancer Res* 60:2840-2844.
- Kleber M, Lee HY, Wurdak H, Buchstaller J, Riccomagno MM, Ittner LM, Suter U, Epstein DJ, Sommer L (2005)** Neural crest stem cell maintenance by combinatorial Wnt and BMP signaling. *J Cell Biol* 169:309-320.
- Kollar EJ, Baird GR (1969)** The influence of the dental papilla on the development of tooth shape in embryonic mouse tooth germs. *J Embryol Exp Morphol* 21: 131-148.
- Kollar EJ, Baird GR (1970).** Tissue interactions in embryonic mouse tooth germs. II. The inductive role of the dental papilla. *J Embryol Exp Morphol* 24:173-186.

- Kontges G, Lumsden A.** (1996) Rhombencephalic neural crest segmentation is preserved throughout craniofacial ontogeny. *Development* 122:3229-3242.
- Kratochwil K, Dull M, Farinas I, Galceran J, Grosschedl R** (1996) Lef1 expression is activated by BMP-4 and regulates inductive tissue interactions in tooth and hair development. *Genes Dev* 10:1382-1394.
- Kratochwil K, Galceran J, Tontsch S, Roth W, Grosschedl R** (2002) FGF4, a direct target of LEF1 and Wnt signaling, can rescue the arrest of tooth organogenesis in Lef1(-/-) mice. *Genes Dev* 16: 3173-3185.
- Krebsbach PH, Lee SK, Matsuki Y, Kozak CA, Yamada KM, Yamada Y** (1996) Full-length sequence, localization, and chromosomal mapping of ameloblastin. A novel tooth-specific gene. *J Biol Chem* 271:4431-4435.
- Kubler M.D, Lesot H, Ruch J.V** (1988) Temporo-spatial distribution of matrix and microfilament components during odontoblast and ameloblast differentiation. *Roux. Arch. Dev. Biol* 197:212-220.
- Kumar S, Balczarek KA, Lai ZC** (1996) Evolution of the hedgehog gene family. *Genetics* 142:965-972.
- Kwon YK, Bhattacharyya A, Alberta JA, Giannobile WV, Cheon K, Stiles CD, Pomeroy SL** (1997) Activation of ErbB2 during wallerian degeneration of sciatic nerve. *J Neuroscience* 17: 8293-8299.
- Lesot H, Osman M, Ruch JV** (1981) Immunofluorescent localization of collagens, fibronectin, and laminin during terminal differentiation of odontoblasts. *Dev Biol* 82:371-381.
- Lesot H, Karcher-Djuricic V, Mark M, Meyer JM, Ruch JV** (1985) Dental cell interaction with extracellular-matrix constituents: type-I collagen and fibronectin. *Differentiation* 29:176-181.
- Lesot H, Karcher-Djuricic V, Kubler MD, Ruch JV** (1988) Membrane-cytoskeleton interactions: inhibition of odontoblast differentiation by a monoclonal antibody directed against a membrane protein. *Differentiation* 37:62-72.
- Lesot H, Smith A.J, Tzafias D, Bègue-Kirn C, Cassidy N, Ruch J.V** (1994) Biologically active molecule and dental tissue repair, a comparative review of reactionary and reparative dentinogenesis with induction of odontoblast differentiation in vitro. *Cells Mater* 4:199-218.
- Lesot H, Vonesch JL, Peterka M, Tureckova J, Peterkova R, Ruch JV** (1996) Mouse molar morphogenesis revisited by three-dimensional reconstruction. II. Spatial distribution of mitoses and apoptosis in cap to bell staged first and second upper molar teeth. *Int J Dev Biol* 40:1017-1031.

- Lesot H, Peterkova R, Schmitt R, Meyer JM, Viriot L, Vonesch JL, Senger B** (1999) Initial features of the inner dental epithelium histo-morphogenesis in the first lower molar in mouse. *Int J Dev Biol* 43: 245-254.
- Lesot H, Kieffer-Combeau S, Fausser JL, Meyer JM, Perrin-Schmitt F, Peterkova R, Peterka M, Ruch JV** (2002) Cell-cell and cell-matrix interactions during initial enamel organ histomorphogenesis in the mouse. *Connect Tissue Res* 43: 191-200.
- Lin X, Perrimon N** (2002) Developmental roles of heparan sulfate proteoglycans in *Drosophila*. *Glycoconj J* 19:363-368.
- Lisi S, Peterkova R, Peterka M, Vonesch JL, Ruch JV, Lesot H** (2003) Tooth Morphogenesis and Pattern of Odontoblast Differentiation. *Connect Tissue Res* 44: 167-170
- Liu F, Ventura F, Doody J, Massague J** (1995) Human type II receptor for bone morphogenic proteins (BMPs): extension of the two-kinase receptor model to the BMPs. *Mol Cell Biol* 15:3479-3486.
- Lumsden AG** (1988) Spatial organization of the epithelium and the role of neural crest cells in the initiation of the mammalian tooth germ. *Development* 103:155-169.
- Lyons KM, Pelton RW, Hogan BL** (1990) Organogenesis and pattern formation in the mouse: RNA distribution patterns suggest a role for bone morphogenetic protein-2A (BMP-2A). *Development* 109:833-844.
- Maas R, Bei M** (1997) The genetic control of early tooth development. *Crit Rev Oral Biol Med* 8:4-39.
- Macias D, Ganan Y, Ros MA, Hurle JM.** (1996) In vivo inhibition of programmed cell death by local administration of FGF-2 and FGF-4 in the interdigital areas of the embryonic chick leg bud. *Anat Embryol (Berl)* 193:533-541.
- Mansukhani A, Dell'Era P, Moscatelli D, Kornbluth S, Hanafusa H, Basilico C** (1992) Characterization of the murine BEK fibroblast growth factor (FGF) receptor: activation by three members of the FGF family and requirement for heparin., *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:3305-3309.
- Marigo V, Johnson RL, Vortkamp A, Tabin CJ.** (1996) Sonic hedgehog differentially regulates expression of GLI and GLI3 during limb development. *Dev Biol.* 1996 Nov 25;180(1):273-283.
- McKeehan , Wang F, Kan M.** (1998) The heparan sulfate-fibroblast growth factor family: diversity of structure and function. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol*59:135-176.
- Merino R, Ganan Y, Macias D, Rodriguez-Leon J, Hurle JM.** (1999) Bone morphogenetic proteins regulate interdigital cell death in the avian embryo. *Ann N Y Acad Sci* 887:120-132.

- Meyer JM, Staubli A, Ruch JV** (1981). Ruthenium rad staining and tannic acid fixation of dental basement membrane. *Cell Tissue Res* 220:589-597.
- Meyer JM, Lesot H, Staubli A, Ruch JV** (1989) Immunoperoxidase localization of fibronectin during odontoblast differentiation. An ultrastructural study. *Biol Struct Morphog* 2:19-24.
- Miller JR** (2002) The Wnts. *Genome Biol* 3(1):REVIEWS3001.
- Mina M, Kollar EJ** (1987) The induction of odontogenesis in non-dental mesenchyme combined with early murine mandibular arch epithelium. *Arch Oral Biol* 32:123-127.
- Mohammadi M, McMahon G, Sun L, Tang C, Hirth P, Yeh BK, Hubbard SR, Schlessinger J.** (1997) Structures of the tyrosine kinase domain of fibroblast growth factor receptor in complex with inhibitors. *Science* 276:955-960.
- Montero JA, Ganan Y, Macias D, Rodriguez-Leon J, Sanz-Ezquerro JJ, Merino R, Chimal-Monroy J, Nieto MA, Hurlé JM** (2001) Role of FGFs in the control of programmed cell death during limb development. *Development* 128:2075-2084.
- Moradian-Oldak J** (2001) Progressive accretion of amelogenin molecules during nanospheres assembly revealed by atomic force microscopy. *Matrix Biol* 20:387-395.
- Moscatelli D** (1987) High and low affinity binding sites for basic fibroblast growth factor on cultured cells: absence of a role for low affinity binding in the stimulation of plasminogen activator production by bovine capillary endothelial cells. *J Cell Physiol* 131:123-130.
- Nadiri A, Kuchler-Bopp S, Haïkel Y, Lesot H** (2004). Immunolocalization of BMP-2/-4, FGF-4 and WNT10b in the developing mouse first lower molar. *J Histochem Cytochem* 52:103-112.
- Nadiri A, Kuchler-Bopp S, Perrin-Schmitt F, Haïkel Y, Lesot H**, Expression patterns of BMPRs in the developing mouse molar, *Journal of Histochemistry and Cell Biology*. *submitted*
- Neubuser A, Peters H, Balling R, Martin GR** (1997) Antagonistic interactions between FGF and BMP signaling pathways: a mechanism for positioning the sites of tooth formation. *Cell* 90:247-255.
- Neumann CJ, Cohen SM** (1997) Long-range action of Wingless organizes the dorsal-ventral axis of the *Drosophila* wing. *Development* 124: 871-880.
- Niehrs (1999)** Head in the WNT: the molecular nature of Spemann's head organizer. *Trends Genet.* 15:314-319.
- Nusse R** (2002) WNT targets. Repression and activation *Trends Genet* 15:1-3.

- Nybakken K, Perrimon N** (2002) Hedgehog signal transduction: recent findings. *Curr Opin Genet Dev* 12:503-511.
- Obara N, Lesot H** (2004). Subcellular localization of  $\beta$ -catenin and cadherin expression in the cap stage enamel organ of the mouse molar. *Histochem Cell Biol* 121:351-358.
- Onishi T, Ishidou Y, Nagamine T, Yone K, Imamura T, Kato M, Sampath TK, ten Dijke P, Sakou T** (1998) Distinct and overlapping patterns of localization of bone morphogenetic protein (BMP) family members and a BMP type II receptor during fracture healing in rats. *Bone* 22:605-612.
- Ornitz DM, Xu J, Colvin JS, McEwen DG, MacArthur CA, Coulier F, Gao G, Goldfarb M** (1996) Receptor specificity of the fibroblast growth factor family. *J Biol Chem* 271:15292-15297.
- Ornitz DM.** (2000) FGFs, heparan sulfate and FGFRs: complex interactions essential for development. *Bioessays* 22:108-12.
- Ornitz DM, Itoh N** (2001) Fibroblast growth factors. *Genome Biol* 2: 1-12.
- Osman A et Ruch. JV** (1976) [Topographic distribution of mitosis in the lower incisor and 1st molar in the mouse embryo]. *J Biol Buccale* 4:331-48.
- Osman M, Ruch JV** (1981) Behavior of odontoblasts and basal lamina of trypsin or EDTA-isolated mouse dental papillae in short-term culture. *J Dent Res* 60:1015-1027.
- Panchision DM, Pickel JM, Studer L, Lee SH, Turner PA, Hazel TG, McKay RD** (2001) Sequential actions of BMP receptors control neural precursor cell production and fate. *Genes Dev* 15:2094-2110.
- Parr BA, McMahon AP** (1994) Wnt genes and vertebrate development. *Curr Opin Genet Dev* 4: 523-528.
- Peretto P, Cummings D, Modena C, Behrens M, Venkatraman G, Fasolo A, Margolis FL** (2002) BMP mRNA and protein expression in the developing mouse olfactory system. *J Comp Neurol* 451: 267-278.
- Peterkova R, Peterka M, Vonesch JL, Tureckova J, Viriot L, Ruch JV, Lesot H** (1998) Correlation between apoptosis distribution and BMP-2 and BMP-4 expression in vestigial tooth primordia in mice. *Eur J Oral Sci* 106: 667-670.
- Peters H, Balling R** (1999) Teeth Where and how to make them. *Trends Genet* 15:59-65.

**Peters H, Neubuser A, Balling R** (1998) Pax genes and organogenesis: Pax9 meets tooth development. *Eur J Oral Sci* 1:38-43.

**Pispa J, Jung HS, Jernvall J, Kettunen P, Mustonen T, Tabata MJ, Kere J, Thesleff I** (1999) Cusp patterning defect in Tabby mouse teeth and its partial rescue by FGF. *Dev Biol* 216:521-534.

**Raff MC** (1992) Social controls on cell survival and cell death. *Nature* 356:397-400.

**Reichsman F, Smith L, Cumberledge S** (1996) Glycosaminoglycans can modulate extracellular localization of the wingless protein and promote signal transduction. *J Cell Biol* 135:819-827.

**Ruch JV** (1984) Tooth morphogenesis and differentiation. In *Dentin and Dentinogenesis* (Ed. Linde A.), p. 47-97. CRC Press, Boca Raton

**Ruch JV.** (1985) Odontoblast differentiation and the formation of the odontoblast layer. *J. Dent Res.* 64:489-498.

**Ruch JV** (1987) Determinisms of odontogenesis. *Revis Biol Celular* 14:1-99.

**Ruch J.V, Lesot H, Begue-Kirn C** (1995) Odontoblast differentiation. *Int. J. Dev. Biol.* 39: 51-68.

**Ruch JV.** (1995) Tooth crown morphogenesis and cytodifferentiations: candid questions and critical comments. *Connect Tissue Res* 32:1-8.

**Ruch JV** (1998) Odontoblast commitment and differentiation. *Biochem Cell Biol* 76:923-938.

**Salmivirta K, Gullberg D, Hirsch E, Altruda F, Ekblom P** (1996). Integrin subunit expression associated with epithelial-mesenchymal interactions during murine tooth development. *Dev Dyn* 205:104-113.

**Sarkar L, Sharpe PT** (1999) Expression of Wnt signalling pathway genes during tooth development. *Mech Dev* 85:197-220.

**Schmitt R, Lesot H, Vonesch JL, Ruch JV** (1999) Mouse odontogenesis in vitro: the cap-stage mesenchyme controls individual molar crown morphogenesis. *Int J Dev Biol* 43: 255-260.

**Seger R, Krebs EG** (1995) The MAPK signaling cascade. *FASEB J* 9: 726-735.

**Sharma PK, Kharbanda OP** (1991) Role of programmed cell death in dental anomalies associated with cleft lip and palate. *Med Hypotheses* 36:98-100.

- Sharpe PT** (1995) Homeobox genes and orofacial development. *Connect Tissue Res* 32:17-25.
- Sherman L, Wainwright D, Ponta H, Herrlich P** (1998) A splice variant of CD44 expressed in the apical ectodermal ridge presents fibroblast growth factors to limb mesenchyme and is required for limb outgrowth. *Genes Dev* 12: 1058-1071.
- Slootweg PJ, de Weger RA.** (1994) Immunohistochemical demonstration of bcl-2 protein in human tooth germs. *Arch Oral Biol* 39:545-550.
- Smeyne RJ, Vendrell M, Hayward M, Baker SJ, Miao GG, Schilling K, Robertson LM, Curran T, Morgan JI.** (1993) Continuous c-fos expression precedes programmed cell death in vivo. *Nature*. 363:166-169.
- Smith AJ, Matthews JB, Hall R.C** (1998) Transforming growth factor-beta1 (TGF-beta1) in dentine matrix. Ligand activation and receptor expression. *Eur. J. Oral Sci.* 106 Suppl 1:179-184
- Smith AJ, Lesot H** (2001) Induction and regulation of crown dentinogenesis: embryonic events as a template for dental tissue repair? *Crit Rev Oral Biol Med* 12: 425-437.
- Staal FJ, Clevers HC** (2003) Wnt signaling in the thymus. *Curr Opin Immunol* 15:204-208.
- Steller H** (1995) Mechanisms and genes of cellular suicide. *Science* 267:1445-1449.
- Suzuki K, Bachiller D, Chen YP, Kamikawa M, Ogi H, Haraguchi R, Ogino Y, Minami Y, Mishina Y, Ahn K, Crenshaw EB 3rd, Yamada G** (2003) Regulation of outgrowth and apoptosis for the terminal appendage: external genitalia development by concerted actions of BMP signaling. *Development*. 130:6209-6220.
- Szebenyi G, Fallon JF.** (1999). Fibroblast growth factors as multifunctional signaling factors. *Int Rev Cytol* 185:45-106.
- Tabata MJ, Fujii T, Liu JG, Ohmori T, Abe M, Wakisaka S, Iwamoto M, Kurisu K** (2002) Bone morphogenetic protein 4 is involved in cusp formation in molar tooth germ of mice. *Eur J Oral Sci* 110: 114-120.
- Thesleff I, Barrach H.J, Foidart J.M, Vaheri A, Pratt R.M, Martin G.R** (1981) Changes in the distribution of type IV collagen, laminin, proteoglycan and fibronectin during mouse tooth development. *Dev. Biol* 81: 182-192.
- Thesleff I, Vaahtokari A** (1992) The role of growth factors in determination and differentiation of the odontoblastic cell lineage. *Proc. Finn. Dent. Soc.* 88: 357-368.
- Thesleff I, Sharpe PT** (1997) Signalling networks regulating dental development. *Mech Dev* 67: 111-123.

- Thesleff I, Mikkola M** (2002) The role of growth factors in tooth development. *Int Rev Cytol* 217: 93-135.
- Thomas BL, Tucker AS, Qui M, Ferguson CA, Hardcastle Z, Rubenstein JL, Sharpe PT** (1997) Role of Dlx-1 and Dlx-2 genes in patterning of the murine dentition. *Development* 124:4811-4818.
- Tucker AS, Matthews KL, Sharpe PT** (1998) Transformation of tooth type induced by inhibition of BMP signaling. *Science* 282:1136-1138.
- Tucker AS, Sharpe PT** (1999) Molecular genetics of tooth morphogenesis and patterning: the right shape in the right place. *J Dent Res* 78: 826-834.
- Tucker AS, Yamada G, Grigoriou M, Pachnis V, Sharpe PT** (1999) Fgf-8 determines rostral-caudal polarity in the first branchial arch. *Development* 126:51-61.
- Tureckova J, Sahlberg C, Aberg T, Ruch J.V, Thesleff I, Peterkova R** (1995). Comparison of expression of the msx-1, msx-2, BMP-2 and BMP-4 genes in the mouse. *Int. J. Dev. Biol* 39: 459-468.
- Unda FJ, Martin A, Hilario E, Bègue-Kirn C, Ruch JV, Arechaga J** (2000) Dissection of the odontoblast differentiation process in vitro by a combination of FGF1, FGF2 and TGFbeta1. *Dev Dyn* 218: 480-489.
- Vahtokari A, Aberg T, Thesleff I** (1996) Apoptosis in the developing tooth: association with an embryonic signaling center and suppression by EGF and FGF-4. *Development* 122: 121-129.
- Vainio S, Jalkanen M, Vahtokari A, Sahlberg C, Mali M, Bernfield M, Thesleff I** (1991) Expression of syndecan gene is induced early, is transient, and correlates with changes in mesenchymal cell proliferation during tooth organogenesis. *Dev Biol* 147:322-333.
- Vainio S, Karavanova I, Jowett A, Thesleff I** (1993) Identification of BMP-4 as a signal mediating secondary induction between epithelial and mesenchymal tissues during early tooth development. *Cell* 75: 45-58.
- Viriot L, Peterkova R, Vonesch JL, Peterka M, Ruch JV, Lesot H** (1997) Mouse molar morphogenesis revisited by three-dimensional reconstruction. III. Spatial distribution of mitoses and apoptoses up to bell-stages first molar teeth. *Int J Dev Biol* 41: 679-690.
- Viriot L, Lesot H, Vonesch JL, Ruch JV, Peterka M, Peterkova R** (2000) The presence of rudimentary odontogenic structures in the mouse embryonic mandible requires reinterpretation of developmental control of first lower molar histomorphogenesis. *Int J Dev Biol* 44:233-240.

- von Bubnoff A, Cho KW** (2001) Intracellular BMP signaling regulation in vertebrates: pathway or network?. *Dev Biol* 239: 1-14.
- van Noort M, Clevers H** (2002) TCF transcription factors, mediators of Wnt-signaling in development and cancer. *Dev Biol* 244:1-8.
- Yamaguchi TP, Takada S, Yoshikawa Y, Wu N, McMahon AP** (1999) T (Brachyury) is a direct target of Wnt3a during paraxial mesoderm specification. *Genes Dev* 13:3185-3190.
- Yoshida K, Yoshida N, Aberdam D, Meneguzzi G, Perrin-Schmitt F, Stoetzel C, Ruch JV, Lesot H** (1998). Expression and localization of laminin-5 subunits during mouse tooth development. *Dev Dyn* 211:164-176.
- Yoshida K, Yoshida N, Aberdam D, Meneguzzi G, Perrin-Schmitt F, Stoetzel C, Ruch JV, Lesot H** (2000) Differential expression of laminin-5 subunits during incisor and molar development in the mouse. *Int J Dev Biol* 44:337-340.
- Yoshida N, Yoshida K, Stoetzel C, Perrin-Schmitt F, Cam Y, Ruch JV** (2003) Temporo-spatial gene expression and protein localization of matrix metalloproteinases and their inhibitors during mouse molar tooth development. *Dev Dyn* 228:105-112.
- Yu Q, Toole BP** (1997) Common pattern of CD44 isoforms is expressed in morphogenetically active epithelia. *Dev Dyn* 208: 1-10.
- Zardoya R, Abouheif E, Meyer A** (1996) Evolutionary analyses of hedgehog and Hoxd-10 genes in fish species closely related to the zebrafish. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:13036-13041
- Zecca M, Basler K, Struhl G** (1996) Direct and long-range action of a wingless morphogen gradient. *Cell* 87: 833-844.
- Zhang W, Green C, Stott NS** (2002) Bone morphogenetic protein-2 modulation of chondrogenic differentiation in vitro involves gap junction-mediated intercellular communication. *J Cell Physiol* 193: 233-243.
- Zhang H, Hu G, Wang H, Sciavolino P, Iler N, Shen MM, Abate-Shen C.** Heterodimerization of Msx and Dlx homeoproteins results in functional antagonism. *Mol Cell Biol* 17:2920-2932
- Zhang CZ, Li H, Young WG, Bartold PM, Chen C, Waters MJ** (1997) Evidence for a local action of growth hormone in embryonic tooth development in the rat. *Growth Factors* 14:131-143
- Zhang Y, Zhao X, Hu Y, St Amand T, Zhang M, Ramamurthy R, Qiu M, Chen Y** (1999) Msx1 is required for the induction of Patched by Sonic hedgehog in the mammalian tooth germ. *Dev Dyn* 215:45-53.

- Wang HY, Malbon CC (2003)** Wnt signaling, Ca<sup>2+</sup>, and cyclic GMP: visualizing Frizzled functions. *Science* 300:1529-1530.
- Wang YH, Upholt WB, Sharpe PT, Kollar EJ, Mina M (1998)** Odontogenic epithelium induces similar molecular responses in chick and mouse mandibular mesenchyme. *Dev Dyn* 213:386-397.
- Willert K, Nusse R (1998)** Beta-catenin: a key mediator of Wnt signaling. *Curr Opin Genet Dev* 8:95-102.
- Witter K, Lesot H, Peterka M, Vonesch JL, Misek I, Peterkova R (2005)** Origin and developmental fate of vestigial tooth primordia in the upper diastema of the field vole (*Microtus agrestis*, Rodentia). *Arch Oral Biol* 50:401-409.
- Wordinger RJ, Agarwal R, Talati M, Fuller J, Lambert W, Clark AF (2002)** Expression of bone morphogenetic proteins (BMP), BMP receptors, and BMP associated proteins in human trabecular meshwork and optic nerve head cells and tissues. *Mol Vis* 8:241-250.
- Xu X, Jeong L, Han J, Ito Y, Bringas P Jr, Chai Y (2003)** Developmental expression of Smad1-7 suggests critical function of TGF-beta/BMP signaling in regulating epithelial-mesenchymal interaction during tooth morphogenesis. *Int J Dev Biol* 47:31-39.

## Résumé

Le développement dentaire implique une succession d'événements cellulaires : prolifération, apoptose et différenciation. Selon le cas, ces processus peuvent être stimulés par BMP-2, -4, FGF-4 et WNT10b. Les résultats présentés dans ce mémoire concernent trois points complémentaires : **1)** Les BMPs agissant de façon dose-dépendante permettent d'induire des activités cellulaires différentes. En fonction du stade du développement et de leur participation à différentes activités cellulaires, nous avons mis en évidence de l'existence de plusieurs récepteurs de type I et II pour les BMPs, exprimés dans l'épithélium et/ou dans le mésenchyme. Au stade capuchon, à E14, BMPR-IB a été détecté dans l'épithélium contrairement à BMPR-II, ce qui suggère l'existence d'un autre récepteur de type II pour former un dimère fonctionnel. Toujours, dans l'épithélium, mais à E15, la distribution de BMP-4, BMPR-IA et -II, contrairement à celle de BMP-2, est restreinte à la partie interne du NEP, région où les apoptoses sont très nombreuses. La distribution temporo-spatiale de FGF-4 et WNT10b est en accord avec le rôle de ces deux molécules dans la prolifération des cellules épithéliales. **2)** Le mésenchyme dentaire au stade capuchon contrôle non seulement la morphogenèse dentaire, mais restaure l'histogenèse épithéliale. Dans le cas de réassociations mésenchyme/cellules épithéliales ou cellules mésenchymateuses/cellules épithéliales, il demeure néanmoins certaines variations qualitatives dans la signalisation par WNT10b et FGF-4 au sein de l'organe de l'émail nouvellement formé. **3)** L'apoptose est un phénomène important lors du développement. Nos résultats montrent l'existence d'une synergie entre FGF-4 et BMP-4 dans le contrôle de l'apoptose au cours du développement dentaire. Ces deux molécules sont nécessaires à l'expression de Msx2. Cette possibilité est renforcée par la co-distribution du dimère BMPR-IA/-II avec FGFR-1 et FGFR-2 au stade et dans les zones où l'apoptose est intense.

## Abstract

Tooth development results from a set of complementary cellular events: proliferation, apoptosis and differentiation. Depending on cases, these processes could be experimentally stimulated by BMP-2, -4, FGF-4 and WNT10b. Three complementary points were investigated in this work: **1)** BMPs may act in a dose dependent manner and thus induce or stimulate different cellular events. Depending on the developmental stage and their involvement in the control of different cellular activities, we documented the existence of several type I and type II BMP-receptors expressed in the epithelium and/or the mesenchyme. At the cap stage, at E14, BMPR-IB but not BMPR-II was detected in the epithelium, suggesting the existence of another type II receptor to form a functional dimer. Still in the epithelium but at E15, BMP-4, BMPR-IA and -II, but not BMP-2, were restricted to the internal part of the primary enamel knot, region where apoptosis is intense. The localization of FGF-4 and WNT10b supports the role of these two molecules in the epithelial proliferation. **2)** At the cap stage, the dental mesenchyme controls tooth morphogenesis and can induce disorganized epithelial cells to restore a complete histogenesis. Nevertheless, in cell-tissue or cell-cell reassociations, qualitative variations in signaling were observed in the newly formed enamel organ. These concerned WNT10b and FGF-4. **3)** Apoptosis plays a major role in development. Our results show synergistic effect of FGF-4 and BMP-4 in the control of apoptosis during tooth development. These two molecules are necessary for the expression of Msx2. This possibility is reinforced by the co-distribution of BMPR-IA/II dimer with FGFR-1 and FGFR-2 at stages and in areas where apoptosis is intense.