



- Thèse présentée pour obtenir le grade de
- Docteur de l'Université Louis Pasteur
- Strasbourg I
- 
- 

Discipline :

**SCIENCES ODONTOLOGIQUES**

**DYSPLASIE ECTODERMIQUE HYPOHIDROTIQUE LIEE A L'X :  
PHENOTYPES OSSEUX ET DENTAIRE CHEZ L'HOMME ET LA SOURIS TABBY**

**François CLAUSS**

Laboratoire de rattachement : UMR INSERM 595

Soutenue publiquement le 18 novembre 2008

**JURY**

<b>Directeur de thèse :</b>	Monsieur le Docteur H. LESOT
<b>Co-directeur de thèse :</b>	Madame le Professeur M-C. MANIERE
<b>Rapporteur interne :</b>	Madame le Professeur H. DOLLFUS
<b>Rapporteur externe :</b>	Monsieur le Professeur H. MAGLOIRE
<b>Rapporteur externe :</b>	Monsieur le Professeur G. BOIVIN
<b>Examineur :</b>	Monsieur le Professeur M. SCHMITTBUHL
<b>Membre invité :</b>	Monsieur le Professeur L-F. JACQUELIN



## REMERCIEMENTS

---

### **Monsieur le Docteur Hervé LESOT**

Vous m'avez fait l'honneur de m'accueillir au sein de votre équipe, de diriger ce travail et de me transmettre votre expérience scientifique, je vous en suis reconnaissant.

### **Madame le Professeur Marie-Cécile MANIERE**

Veillez trouver ici l'expression de mes sincères remerciements et ma profonde gratitude pour votre confiance, votre patience, votre écoute, votre implication dans ce travail et votre précieuse aide dans mon parcours depuis le début de mon assistantat hospitalo-universitaire.

### **Madame le Professeur Hélène DOLLFUS**

Vous me faites l'honneur d'être le rapporteur de cette thèse. Veuillez trouver ici l'expression de ma profonde admiration pour votre travail et toute ma reconnaissance pour m'enrichir de votre approche clinique et scientifique.

### **Monsieur le Professeur Henri MAGLOIRE**

Vous me faites l'honneur d'avoir accepté d'être rapporteur de cette thèse. Veuillez trouver ici l'expression de ma reconnaissance pour vos encouragements et votre regard scientifique porté sur ce travail.

### **Monsieur le Professeur Georges BOIVIN**

Vous me faites l'honneur d'être rapporteur de cette thèse. Veuillez trouver l'expression de mes sincères remerciements pour votre disponibilité et votre apport dans ce travail, ainsi que toute mon admiration pour votre activité scientifique.

### **Monsieur le Professeur Matthieu SCHMITTBUHL**

Vous me faites l'honneur de participer à ce Jury de thèse. Je trouve ici l'opportunité de vous exprimer ma sincère reconnaissance pour votre implication personnelle d'une grande qualité scientifique dans ce travail, pour le temps que vous y avez consacré, ainsi que pour votre patience, votre énergie et votre pédagogie.

### **Monsieur le Professeur Louis-Frédéric JACQUELIN**

Vous me faites l'honneur de participer à ce Jury de thèse. Veuillez trouver ici l'expression de ma profonde considération et de mes remerciements pour le temps consacré à ce travail.

A tous mes chers Collègues de l'UMR 595, à mon co-thésard Adnan, merci pour votre soutien dans les derniers moments difficiles, votre aide scientifique pour l'histochimie et la microscopie.

Madame le Docteur PETERKOVA (Laboratoire de Médecine Expérimentale de Prague), merci pour votre réflexion scientifique et votre accueil au sein de votre laboratoire.

Merci à messieurs les Docteurs CHASSAING et ALEMBIK pour votre implication dans ce travail, votre disponibilité et vos conseils.

Merci aux médecins du Service de Dermatologie de l'Hôpital Necker, Professeur BODEMER, Docteur HADJ-RABIA et Karyn pour m'avoir accueilli avec gentillesse et compétence au sein de votre unité, je trouve ici la possibilité de vous exprimer l'honneur que j'ai à collaborer avec vous.

Merci à mes chers collègues biostatisticiens, Docteur MEYER, Docteur SENGER, Docteur FAUXPOINT pour leur apport, leur soutien et leur gentillesse. Merci au personnel de l'IGBMC, Docteur VONESCH et ses collaborateurs, pour votre aide dans le traitement des images 3D.

Merci à Madame Olivia NICLAS, Présidente de l'Association Française Dysplasie Ectodermique et de la Fédération des Maladies Orphelines, pour votre écoute, votre soutien et votre admirable implication personnelle, en espérant que notre collaboration sera longue et fructueuse.

A tous mes collègues et amis de l'Unité Fonctionnelle d'Odontologie Pédiatrique, merci pour votre enthousiasme, votre aide sans failles, votre humour et votre esprit positif qui m'ont toujours aidé.

Merci à Chantal et Sébastien, pour votre expertise dans le domaine de l'informatique, ainsi que pour le temps que vous avez consacré à ce travail. J'ai grand plaisir à collaborer avec vous.

A tous mes amis de la Faculté de Chirurgie Dentaire, Collègues assistants hospitalo-universitaires, internes, leurs compagnes et compagnons respectifs, merci pour votre aide, votre soutien et votre amitié.

*Je dédie ce travail aux enfants et à leurs familles...*



*Papa, Maman, Marc et Estelle, vous m'avez soutenu, écouté et aidé avec une générosité et une patience indéfectibles durant ce long parcours universitaire de 10 ans, je vous remercie ici pour votre gentillesse, votre simplicité, vos sacrifices qui me touchent au plus haut point et serai toujours reconnaissant. Vous m'avez pardonné avec compréhension mes absences durant ces mois difficiles, Merci pour tout ce que vous avez fait pour moi et surtout pour ce que vous êtes.*

*A toute ma chère famille, Laurence, Hubert, Sandra, Sylvain, Gérard, Claudine, vous m'avez toujours écouté et avez été présents à mes côtés.*

*Chère Sophie, le moment est maintenant venu pour moi de t'exprimer mon Amour et mille mercis pour ton infinie patience, tu as été compréhensive et aimante de façon admirable, merci pour cela. Tu as accepté avec philosophie et une extrême douceur ces « épreuves », j'en ferai de même pour celles à venir. De nouvelles vies nous attendent maintenant, nous saurons en profiter et j'essaierai de t'aider comme tu l'as fait pour moi.*

*Merci à toute la famille Jung, Betty, Guy, Géraldine, Mémé et ses bons gâteaux, Pépé, Mimi et Papi, Marc, Léone, Célia, Benjamin, Christian, Patricia, Caroline et Adrien, vous m'avez accueilli au sein de votre famille avec gentillesse. Merci pour tous les très agréables moments passés avec vous, votre humour et votre énergie.*

*A mes chers compagnons de route en Roumanie, Annelise, Amélie, Kenza, Elise, Radu, Diana, Arina, Marie-Laure, Bérange, Catherine, merci pour ces belles aventures et ces moments passés ensemble.*

*A mes chers amis Nico, Marie-Noëlle, Alain, Nadine, Fred, Audrey T, Aurélie, Arnaud, Fabien, Audrey...Merci pour votre amitié indestructible malgré la distance et mes silences.*



# TABLE DES MATIERES

---

<b>Introduction</b>	1
<b>CHAPITRE I DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES</b>	4
<b>LES DYSPLASIES ECTODERMIQUES HYPOHIDROTiques (DEH) : ETAT DES CONNAISSANCES SUR LES ASPECTS PHENOTYPIQUES DENTO-CRANIO-FACIAUX ET MOLECULAIRES.</b>	6
<b>1. Présentation générale du spectre phénotypique et moléculaire des Dysplasies Ectodermiques Hypohidrotiques</b>	6
1.1 Les classifications phénotypiques des DEH	6
1.2 Les classifications clinico-moléculaires des DEH	8
1.3 Epidémiologie génétique de la DEX et des DEH autosomiques	11
1.3.1 Epidémiologie génétique de la DEX	11
1.3.2 Epidémiologie génétique des DEH autosomiques	13
1.4. Phénotype dentaire associé aux DEH	14
1.4.1 Phénotype en denture temporaire	14
1.4.2 Phénotype en denture permanente	15
1.4.3 Variabilité phénotypique dentaire et hétérogénéité génétique des DEH	16
1.4.4 Corrélations génotype-phénotype dentaire dans la DEX	17
1.4.5 Phénotype dentaire associé aux femmes vectrices hétérozygotes pour la mutation <i>EDA</i>	18
1.5 Phénotype associé aux formes autosomiques dominantes et récessives de DEH	21
1.6 Phénotype crânio-facial associé aux DEH	22
1.6.1 Phénotype crânio-facial associé à la DEX	22
1.6.2 Phénotype crânio-facial associé aux formes autosomiques de DEH	24
1.7 Extension du spectre phénotypique : manifestations osseuses associées à la DEX	26

<b>2. La voie de transduction EDA-TRAF-IKK-NF-<math>\kappa</math>B : fonctions moléculaires et implications dans le phénotype osseux</b>	<b>27</b>
2.1 Structure moléculaire et organisation génomique de l'Ectodysplasine (EDA)	27
2.1.1 Gène <i>EDA</i>	27
2.1.2 Gène <i>Ta</i>	29
2.1.3 Structure moléculaire de l'EDA	30
2.2 Distribution tissulaire de l'EDA ( <i>Ta</i> )	34
2.2.1 Distribution au niveau des structures ectodermiques et extra-ectodermiques	34
2.2.2 Expression tissulaire de l'EDA au niveau osseux	38
2.2.3 Profil d'expression de l'EDA durant l'odontogenèse	40
2.3 La voie EDA-TRAF-IKK-NF- $\kappa$ B dans le développement ectodermique et osseux	42
2.3.1 Le complexe moléculaire EDA-EDAR-TAB2-TAK1-TRAF6	42
2.3.2 Fonctions biologiques de TRAF6	44
2.3.3 Interactions entre les voies de l'EDA et RANKL via TRAF6 et NF- $\kappa$ B	45
2.3.4 Interactions moléculaires entre EDA-NF- $\kappa$ B et les voies de signalisation Wnt, Activine- $\beta$ , FGF, BMP et EGF	46
2.4 Les voies de signalisation RANKL (Receptor Activator NF- $\kappa$ B Ligand)-EDA-NF- $\kappa$ B	51
2.4.1 Structure et fonctions de la voie RANKL-RANK-NF- $\kappa$ B	51
2.4.2 Le facteur transcriptionnel NF- $\kappa$ B et inactivations des sous-unités monomériques Rel	54
2.5 Le facteur NF- $\kappa$ B Essential Modulator (NEMO)	56
2.6 Pathologies métaboliques osseuses avec dysfonctionnement de la voie NF- $\kappa$ B	58
<b>3. LE DEVELOPPEMENT CRANIO-FACIAL ET OSSEUX : IMPLICATIONS DE LA VOIE EDA-NF-<math>\kappa</math>B</b>	<b>61</b>
3.1 Rôle de la voie EDA-NF- $\kappa$ B dans l'induction neurale et la différenciation des crêtes neurales céphaliques	61
3.2 Interactions moléculaires entre la voie EDA-NF- $\kappa$ B et les facteurs Wnt et BMP- <i>Msx</i>	63
3.3 Interactions entre EDA et FGF	66
3.4 EDA/TA et développement squelettique mandibulaire	67
<b>4. THERAPEUTIQUES IMPLANTAIRES DANS LA DEH.</b>	<b>68</b>

## **PHENOTYPE DENTAIRE ET OSSEUX DU MODELE EXPERIMENTAL MURIN DE DEX : LA SOURIS**

<b>TABBY</b>	69
1. Phénotype dentaire du modèle Tabby	69
2. Phénotype osseux associé à la mutation Tabby	72
<b>PROBLEMATIQUE, OBJECTIFS ET STRATEGIE</b>	75
1. Hypothèses de travail	75
2. Objectifs expérimentaux	76
3. Stratégie	77
<b>CHAPITRE II RESULTATS</b>	78
1. <b>Publication A</b> « Dento-cranio-facial phenotypes and underlying molecular mechanisms in Hypohidrotic Ectodermal Dysplasia (HED) : a review »	80
2. <b>Protocole de recherche clinique</b>	84
2.1 Matériels	84
2.1.1 Critères d'éligibilité	84
2.1.2 Inclusion des patients	86
2.2 Méthodes	86
2.2.1 Examens cliniques et radiologiques	86
2.2.2 Analyses phénotypiques	87
A) Phénotype dentaire	87
B) Phénotype osseux	89
2.2.3 Plan expérimental	91
2.3 Population étudiée	92
2.3.1 Provenance des patients	92
2.3.2 Génotypage des patients atteints de DEX et de DEH autosomique	92
2.3.3 Représentativité de l'échantillon de l'étude	97
3. <b>Phénotype dentaire</b>	99
3. 1 Article en préparation "Genotypes and dental phenotype analyses in 26 families with X-linked and autosomal Hypohidrotic Ectodermal Dysplasia"	99

3.2 Résultats complémentaires	102
3.2.1 Comparaison phénotype dentaire - phénotype dermatologique	102
3.2.2 Explorations des corrélations génotype-phénotype dentaire	103
3.2.3 Discussion	104
<b>4. Champs morphogénétiques : rôle de l'EDA</b>	<b>117</b>
<b>Publication B</b> "Morphogenetic fields within the human dentition: a new clinically relevant synthesis of an old concept"	117
<b>5. Phénotype osseux associé à la DEH</b>	<b>120</b>
5.1 Article en préparation "X-linked hypohidrotic ectodermal dysplasia: consequences on jaw bone in human"	120
5.2 Résultats complémentaires : densité osseuse en fonction du type de mutation et de l'âge	122
5.3 Discussion	128
<b>6. Phénotype osseux du modèle murin Tabby de la DEX</b>	<b>131</b>
6.1 Article en préparation "Incisor and mandibular alveolar bone phenotypes in the Tabby mouse"	131
6.2 Analyse histochimique et immunohistochimique de l'os mandibulaire et fémoral de souris Wt et Ta adultes	136
6.2.1 Matériel et méthodes : histologie, immunologie et dosage ELISA des taux sériques de PTH	136
6.2.2 Résultats	139
6.2.3 Discussion	140
<b>CHAPITRE III DISCUSSION ET PERSPECTIVES</b>	<b>151</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE</b>	<b>160</b>
<b>ANNEXES</b>	<b>178</b>
<b>Annexe 1</b> : Publication C : Les dysplasies ectodermiques : présentation du syndrome, des prises en charge thérapeutiques et des orientations de recherche.	
<b>Annexe 2</b> : Phénotype dentaire : données iconographiques des patients et tableaux	
<b>Annexe 3</b> : Phénotype osseux : données iconographiques des patients et tableaux	

## ABRÉVIATIONS

---

Ac	Anticorps	I2	Incisive latérale permanente
ALP	Alkaline Phosphatase	Ig	Immunoglobuline
ANS	Anterior nasal spine	IKK	Inhibitor Kappa Kinase
Ar	Articular	K.O	Knock-out
Ba	Basion	M	Molaire
Barx1	Bar-Homeobox-1	MEB	Microscope électronique à balayage
BSP	Bone Sialoprotein	Msx	Muscle-Segment Homeobox
C :	Canine permanente	Na	Nasion
Cbfa1	Core Binding Factor 1	NEMO	NF- $\kappa$ B Essential Modulator
CTGF	Connective Tissue Growth Factor	NFAT	Nuclear Factor Activated T-Cells
DEH	Dysplasie ectodermique hypohidrotique	OPN	Ostéopontine
DI	Downless (équivalent murin du récepteur EDAR)	Pax	Paired Homeobox-9
DEX	Dysplasie ectodermique hypohidrotique liée à l'X	PND	Post-natal Day
Dlx	Distal-less Homeobox	Pog	Pogonion
dI1	Incisive centrale temporaire	PM	Prémolaire
dI2	Incisive latérale temporaire	RANK	Receptor Activator NF- $\kappa$ B
dC	Canine temporaire	RANKL	Receptor Activator NF- $\kappa$ B Ligand
dM	Molaire temporaire	RT-PCR	Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction
EDA	Ectodysplasin	S :	Selle turcique
EDAR	Ectodysplasin Receptor	Ta :	Tabby
EDARADD	Ectodysplasin Receptor Associated Death-Domain	TAB2 :	TAK1-Binding-Protein-2
EK1	Enamel Knot Primaire	TAK1	TGF- $\beta$ -1-Activating-Kinase-1
Go	Gonion	TNAP	Tissu Non-specific Alkaline Phosphatase
I1	Incisive centrale permanente	TRAF	Tumor Necrosis Factor Receptor Associated Factor





## FIGURES

---

Fig 1	Manifestations phénotypiques des DEH	20
Fig 2	Aspects cliniques et radiologiques de l'oligodontie associée à la DEX	28
Fig 3	Aspects cliniques et radiologiques d'une femme hétérozygote pour une mutation EDA	33
Fig 4	Aspects cliniques et téléradiographiques du phénotype crânio-facial associé à la DEX	38
Fig 5	Distribution des mutations pathogènes de la DEX sur le locus EDA	45
Fig 6	Structures moléculaires bidimensionnelles et tridimensionnelles de l'EDA	46
Fig 7	Immunolocalisation des transcrits EDA et Ta au niveau des structures ectodermiques et extra-ectodermiques	50
Fig 8	Expression de l'EDA au niveau ostéoblastique	52
Fig 9	Analyse par hybridation in situ de l'expression des transcrits de DI	52
Fig 10	Code odontogène de gènes homéotiques et immunolocalisation de l'EDA durant l'odontogenèse	54
Fig 11	Voie de transduction de l'EDA-NF-κB	56
Fig 12	Phénotype cutané-phanérien et squelettique des souris knock-out TRAF6-/-	60
Fig 13	Interactions moléculaires entre les voies de signalisation EDA-NF-κB-BMP-Msx1-FGF et activine-β	63
Fig 14	Mécanismes moléculaires d'activation du facteur NF-κB et des pathologies métaboliques osseuses NF-κB	74
Fig 15	Structures crânio-faciales embryonnaires et crêtes neurales céphaliques	76
Fig 16	Morphotypes molaires Tabby postnataux	87
Fig 17	Modifications histologiques osseuses associées au modèle murin Tabby	91
Fig 18	Classification des densités osseuses selon Lekholm et Zarb	104
Fig 19	Population générale et distribution des patients DEX et DEH	107
Fig 20	Phénotypes dentaires associés à la DEX	124
Fig 21	Aspects radiologiques des phénotypes dentaires	125
Fig 22	Nombre moyen d'agénésies en denture temporaire et permanente	127
Fig 23	Nombre moyen d'agénésies en denture permanente	128
Fig 24	Nombre moyen d'agénésies maxillaires et mandibulaires	128
Fig 25	Distribution topographique des agénésies dentaires maxillaires en denture temporaire	129
Fig 26	Distribution topographique des agénésies dentaires mandibulaires en denture temporaire	129
Fig 27	Distribution topographique des agénésies dentaires maxillaires en denture permanente	130
Fig 28	Distribution topographique des agénésies dentaires mandibulaires en denture permanente	130
Fig 29	Coupes scanographiques transversale, sagittale et reconstructions tridimensionnelles	140
Fig 30	Phénotypes osseux chez deux patients adultes	141
Fig 31	Illustration des interactions moléculaires entre les voies de l'EDA et RANKL	144
Fig 32	Séries de coupes histologiques de mandibules de souris WT et Ta à 0,5 PND	149
Fig 33	Coupes histologiques de fémurs et de mandibules de souris WT et Ta adultes colorées à l'hématoxyline-éosine	150
Fig 34	Coupes histologiques de diaphyses fémorales de souris WT et Ta adultes	151

Fig 35	Coupes histologiques de métaphyses fémorales de souris WT et Ta adultes colorées au trichrome de Masson	151
Fig 36	Coupes de mandibules de souris WT et Ta colorées au trichrome de Masson	152
Fig 37	Coupes de mandibules de souris WT et Ta colorées au trichrome de Masson	152
Fig 38	Coupes de fémurs de souris WT et Ta colorées au trichrome de Masson	153
Fig 39	Coupes de mandibules de souris WT et Ta colorées au trichrome de Masson	153
Fig 40	Immunodétection de l'ostéopontine sur des coupes de mandibules de souris WT et Ta	154
Fig 41	Immunodétection de l'ostéopontine sur des coupes de mandibules de souris WT et Ta	155
Fig 42	Immunodétection de l'ostéopontine sur des coupes de mandibules de souris WT et Ta	156
Fig 43	Voie de signalisation EDA-NF- $\kappa$ B et phénotypes ostéopérotiques	166

## TABLEAUX

---

Tableau I	Classifications clinico-moléculaires des DEH	22
Tableau II	Principales fonctions cellulaires impliquées dans les DEH	23
Tableau III	Repères anatomiques utilisés pour les analyses céphalométriques	106
Tableau IV	Mesures linéaires et angulaires céphalométriques	106
Tableau V	Nombre de patients inclus en fonction des centres et des examens réalisés	108
Tableau VI	Nombre de patients en fonction des gènes mutés	108
Tableau VII	Génotypes des patients atteints	111
Tableau VIII	Génotype de patients atteints de DEH autosomique	112
Tableau IX	Nombre de patients DEX en fonction des exons du gène EDA mutés	112
Tableau X	Nombre de patients atteints de DEH autosomiques en fonction des exons du gène EDAR mutés	112
Tableau XI	Age, diagnostics cliniques et moléculaires, nombre d'agénésies des patients DEH	123
Tableau XII	Nombre moyen d'agénésies en denture temporaire	126
Tableau XIII	Nombre moyen d'agénésies en denture permanente	126
Tableau XIV	Nombre moyen d'agénésies en denture temporaire	127
Tableau XV	Patients DEX intégrés au protocole d'analyse phénotypique osseuse	138
Tableau XVI	Synthèse des résultats concernant les densités osseuses corticales	139



# **INTRODUCTION**



Les Dysplasies Ectodermiques Hypohidrotiques (DEH) sont des maladies génétiques rares caractérisées par une anomalie du développement des structures ectodermiques (glandes exocrines, phanères et dents). Les anomalies dentaires et leurs effets sur la croissance crânio-faciale constituent le problème clinique et thérapeutique majeur des patients atteints de DEH [Mortier et Wackens, 2004].

Les différentes formes de DEH correspondent à des mutations affectant la voie EDA-NF- $\kappa$ B. Selon la nature de la mutation, on distingue la forme liée au chromosome X (DEX) et les formes autosomiques de DEH. La DEX résulte de mutations du gène *EDA* (OMIM 305100), codant pour une protéine transmembranaire, l'Ectodysplasine-A, qui a été identifiée comme un facteur morphogène épithélial de la famille des Tumor Necrosis Factor (TNF) [Ezer et coll., 1999]. Le vaste spectre phénotypique de la DEX démontre le rôle ubiquitaire de la voie de signalisation Ectodysplasine (EDA)-NF- $\kappa$ B dans le développement embryonnaire.

Ce travail a été mené à l'interface entre les Hôpitaux Universitaires de Strasbourg (HUS) et l'UMR 595. Nous avons étudié chez l'homme les manifestations dentaires et osseuses de la DEX, pour laquelle nous disposons d'un modèle expérimental, la souris Tabby. Cette souris est atteinte d'une mutation du gène *Ta*, qui présente 94% d'homologie avec le gène *EDA* [Sofaer et coll., 1969 ; Srivastava et coll., 1997]. En collaboration avec l'équipe du Dr Peterkova, ce modèle est largement utilisé dans le laboratoire pour étudier les effets de la mutation *EDA* sur la morphogenèse dentaire [Miard et coll., 1999 ; Peterkova et coll., 2001]. D'autres études chez la souris ont montré que des mutations de gènes tels que *Msx1*, *Pax9*, *Axin2* et *EDA* sont responsables d'agénésies dentaires [Matalova et coll., 2008]. Les mutations de ces gènes ont les mêmes conséquences chez l'homme. Nous nous sommes intéressés aux conséquences d'une mutation du gène *EDA* sur les phénotypes dentaire et osseux [Fleischmannova et coll., 2008].

Le volet de recherche clinique a été mené dans le cadre du centre de référence pour les manifestations dentaires des maladies rares (HUS) et grâce aux collaborations établies avec d'une part les services de génétique médicale de Strasbourg et de Toulouse et d'autre part le centre de référence pour les génodermatoses (Pr Bodemer, Service de Dermatologie, Hôpital Necker). Cette collaboration a permis le recrutement des patients à l'échelon national.

Nous avons caractérisé le phénotype dentaire de patients atteints de DEX. Des patients atteints de DEH autosomique (mutation du gène *EDAR*) ainsi que des patients DEH dont le génotypage est en cours ont aussi été intégrés à l'étude. Cette partie concerne la sévérité phénotypique dentaire en fonction du gène muté (*EDA* ou *EDAR*) ou du type de mutation.

Des observations sur le phénotype osseux chez les patients atteints de DEH [Ruhin et coll., 2001], ou chez la souris Tabby [Hill et coll., 2002], nous ont mené au deuxième volet de ce travail. Pour compléter ces données publiées, nous avons recherché des modifications de densité osseuse mandibulaire et maxillaire chez des patients atteints de DEX et de DEH. Ce travail a été réalisé à partir d'examens tomodensitométriques. Certaines approches n'étant pas possibles chez l'homme où le fond génétique est variable, nous avons analysé les manifestations phénotypiques osseuses de souris Tabby à la naissance et adultes. Pour cela, nous avons utilisé des approches histologiques, histomorphométriques et immunohistochimiques.

La confrontation des observations phénotypiques chez l'homme et chez la souris permettrait une meilleure compréhension des anomalies phénotypiques associées au syndrome et des fonctions morphogénétiques de l'EDA. L'objectif de ce travail à plus long terme vise à réorienter le protocole diagnostique et thérapeutique dans la DEX en fonction du statut osseux (morphologie et structure) du patient.



# **CHAPITRE I**

## **DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES**



# **LES DYSPLASIES ECTODERMIQUES HYPOHIDROTiques (DEH) :**

## **ETAT DES CONNAISSANCES SUR LES ASPECTS PHENOTYPIQUES**

### **DENTO-CRANIO-FACIAUX ET MOLECULAIRES**

---

#### **1. PRESENTATION GENERALE DU SPECTRE PHENOTYPIQUE ET MOLECULAIRE DES DYSPLASIES ECTODERMIQUES HYPOHIDROTiques**

---

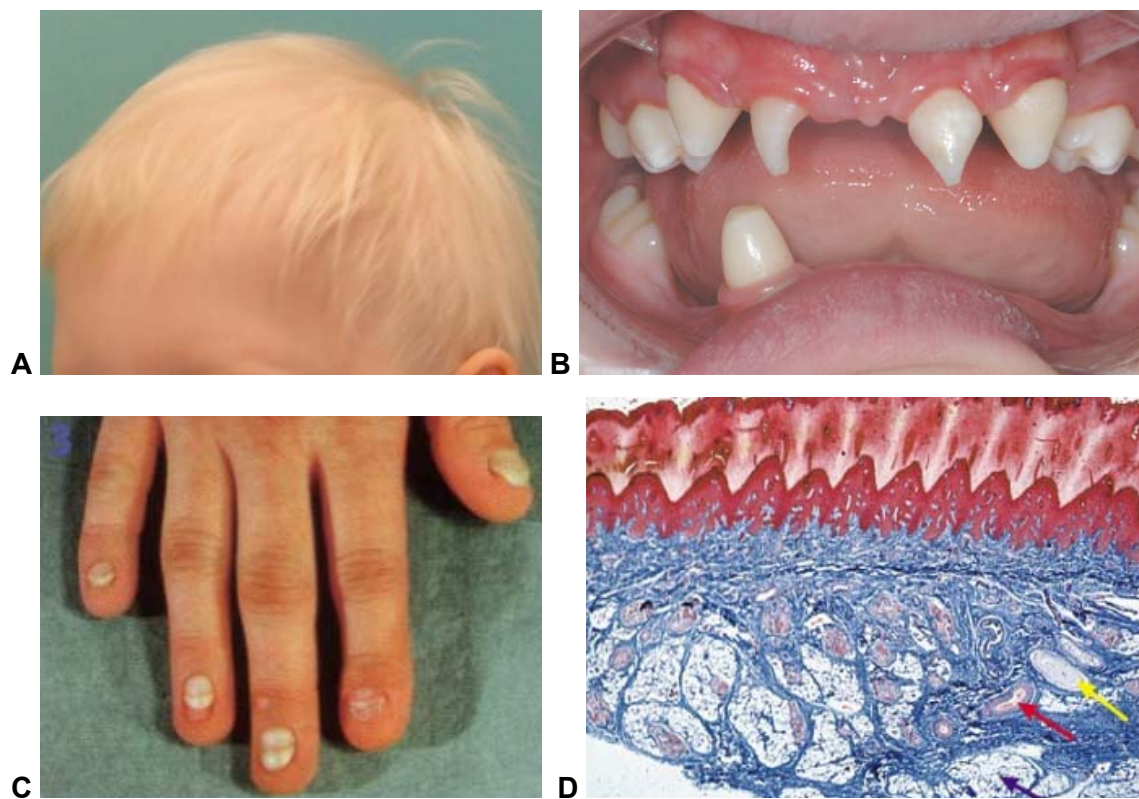
##### **1.1 LES CLASSIFICATIONS PHENOTYPIQUES DES DEH**

Les dysplasies ectodermiques constituent un large groupe nosologique de pathologies du développement regroupant environ 200 syndromes polymalformatifs distincts [Pinheiro et Freire-Maia, 1994, Priolo et coll., 2001, Lamartine, 2003]. L'étiologie commune de ces syndromes est une altération de la morphogenèse ectodermique pouvant être associée à d'autres anomalies du développement, qu'elles soient squelettiques, neurologiques ou cardiaques dans le cadre de DEH syndromiques [Priolo et coll., 2001]. L'ensemble des modes de transmission mendélienne est représenté au sein du groupe des DE, avec des formes autosomiques dominantes et récessives et liées à l'X, ainsi que des cas sporadiques [Pinheiro et Freire-Maia., 1994]. Toutes DEH confondues pures et syndromiques, leur prévalence est estimée à 7/10.000 avec des signes cliniques et altérations fonctionnelles variées affectant les glandes exocrines, le système oculaire ou le complexe dento-crânio-facial [Freire-Maia et Pinheiro, 1990, Itin et coll., 2004].

Les manifestations phénotypiques de ces différents syndromes de la famille des DEH ont en commun une anomalie primaire d'un dérivé ectodermique parmi les dents, les cheveux, les ongles et les glandes exocrines, notamment les glandes sébacées et sudoripares [Freire-Maia et Pinheiro, 1990] (Fig.1). Les mécanismes étiopathogéniques impliqués dans ces différentes dysplasies ectodermiques ont permis l'élaboration de classifications clinico-moléculaires, enrichies régulièrement, parallèlement aux clonages de nouveaux gènes et à la découverte de nouvelles voies de signalisation moléculaire [Itin et coll., 2004]. La voie de transduction la plus étudiée est la voie de l'Ectodysplasine (EDA)-Ectodysplasine Receptor (EDAR)-NF-κB essentielle dans les processus de morphogenèse ectodermique, le gène *EDA* étant muté dans la dysplasie ectodermique hypohidrotique liée à l'X (DEX) [Kere et

coll., 1996 ; Lin et coll., 2004 ; Tariq et coll., 2007 ; Ramadevi et coll., 2008]. Les gènes codant pour le récepteur Ectodysplasin Receptor (EDAR) et Ectodysplasin Receptor Associated Death-Domain (EDARADD) sont mutés dans les formes autosomiques dominantes et récessives de DEH [Chassaing et coll., 2006 ; Lind et coll., 2006 ; Bal et coll., 2007 ; Ramadevi et coll., 2008; Valcuende-Cavero et coll., 2008 ; Van der Hout et coll., 2008].

La forme la plus prévalente de DEH, caractérisée par un spectre phénotypique regroupant des atteintes de l'ensemble des dérivés ectodermiques, est la dysplasie ectodermique hypohidrotique liée à l'X (DEX) [Kere et coll., 1996].



**Fig 1** : Manifestations phénotypiques des DEH liées aux anomalies des différents dérivés ectodermiques avec hypotrichose et trichodysplasie (A), atteinte des dents : agénésies et dysmorphies coronaires de types dents conoïdes (B), onychodysplasie (C) et atteinte des glandes exocrines sous forme d'agénésies ou de dystrophie (notamment des glandes sudoripares et sébacées) (D).

La classification phénotypique de Freire-Maia et Pinheiro [Pinheiro et Freire-Maia, 1994], qui a fait l'objet de remises à jour parallèlement à la découverte de nouveaux syndromes, intègre

les dysplasies pures dyshidrotiques et hidrotiques, mais également les DEH syndromiques, caractérisées par des atteintes extra-ectodermiques, comme *Incontinentia Pigmenti* ou la dysplasie ectodermique avec cardiopathie et atteintes squelettiques ou avec ostéosclérose. De nombreuses autres génodermatoses associées au champ des dysplasies ectodermiques sont également représentées, comme *Pachyonychia Congenita*, le syndrome de Papillon-Lefèvre, le syndrome tricho-dento-osseux, trichorhinophalangéal, oro-facio-digital ou la dysplasie crânio-ectodermique [Pinheiro et Freire-Maia, 1994].

De nombreuses DEH syndromiques intégrées dans la classification clinique de Pinheiro sont caractérisées par des manifestations phénotypiques ectodermiques et squelettiques, suggérant l'existence de voies de signalisation communes aux processus de morphogenèse ectodermique et d'ostéogenèse. En effet, dans le sous-groupe 1-2-3-4, la DEH syndromique avec cardiopathie et anomalies squelettiques est caractérisée par une association d'anomalies ectodermiques et osseuses tout comme les syndromes trichodentoosseux, trichorhinophalangéal et la dysplasie crânio-ectodermique du sous-groupe 1-2-3 [Pinheiro et Freire-Maia, 1994]. Ce sous-groupe comprend d'autres syndromes avec cette association entre anomalies ectodermiques et squelettiques, voire crânio-faciales comme la trichodysplasie avec anomalies dentaires et dolichocéphalie ou la DEH avec altérations faciales et polydactyly [Pinheiro et Freire-Maia, 1994].

Cette association phénotypique est retrouvée dans le sous-groupe 1-2 avec la dysplasie oculo-dento-osseuse ou la DE avec hypoplasie cartilagineuse et hypotrichose. Les syndromes de DE avec maturation squelettique accélérée et anomalies faciales du sous-groupe 1-3 ou de DE avec anomalies squelettiques du sous-groupe 2-3 associent également des anomalies ectodermiques et osseuses.

## **1.2 LES CLASSIFICATIONS CLINICO-MOLECULAIRES DES DEH**

Les classifications clinico-moléculaires permettent l'intégration des caractéristiques génotypiques et moléculaires à la démarche diagnostique [Priolo et Lagana, 2001, Itin et Fistarol, 2004]. Elles consistent à établir un lien entre les gènes mutés, les fonctions moléculaires impliquées et les caractéristiques phénotypiques permettant l'établissement de corrélations génotype/phénotype.

Le **groupe 1** de la première classification génético-clinique est caractérisé par une altération des interactions épithélio-mésenchymateuses durant le développement embryonnaire. La

voie de signalisation TNF-TNFR-NF-κB est impliquée dans l'étiologie moléculaire des syndromes du groupe 1, subdivisés en syndromes à implications majeures ectodermique, immunitaire, squelettique et endocrinienne [Priolo et Lagana, 2001]. Ce premier groupe implique diverses molécules intervenant durant l'embryogenèse comme l'EDA, mais également le complexe régulateur du facteur nucléaire NF-kappaB : NEMO/IKK (NF-KappaB Essential Modulator/Inhibitor Kappa Kinase) dans le cadre de la dysplasie ectodermique avec immunodéficience ou *Incontinentia Pigmenti*, p63 ou les TRAF (TNF Receptors Associated Factors) mutés dans les dysplasies ectodermiques avec atteintes neuro-endocriniennes [Priolo et Lagana, 2001].

Le **groupe 2** de la classification clinico-moléculaire est défini par une anomalie de l'homéostasie squelettique et de la stabilité cellulaire [Priolo et Lagana, 2001]. Les syndromes du groupe 2 son divisés en pathologies avec hyperkératose, surdité-anomalies cornéennes, fente labio-palatine et dégénérescence rétinienne [Priolo et Lagana, 2001].

<b>Groupe 1 : anomalies des interactions épithélio-mésenchymateuses.</b> <b>Voies de signalisation TNF-TNFR-NF-κB</b>	<b>Syndromes</b>
<b>Implications majeures ectodermiques</b>	DEX, DE autosomique, DE hydrotique, syndrome amélo-onycho-hypohidrotique
<b>Immunodéficience, anomalies immunitaires, anomalies fonctionnelles du système nerveux central</b>	<i>Incontinentia Pigmenti</i> : mutation NEMO (NF-κB Essential Modulator) DE avec immunodéficience : mutation NEMO DE avec immunodéficience-ostéopétrose-lymphoedème : mutation NEMO
<b>Implications squelettiques majeures</b>	Syndromes p63 : syndrome de Rapp-Hodgkin, EEC (Ectrodactyly-Ectodermal-Dysplasia-Cleft lip-palate) et AEC (Ankyloblépharon, Ectodermal Dysplasia, Cleft-lip-palate), Limb-Mammary Syndrome (LMS) Syndrome EvC : Dysplasie chondro-ectodermique

**Tableau I** : Classifications clinico-moléculaires avec corrélations entre les voies de signalisation moléculaire mutées et les phénotypes correspondants [Priolo et Lagana, 2001].

La classification clinico-moléculaire de Lamartine identifie les fonctions cellulaires impliquées dans les DEH pures et syndromiques [Lamartine, 2003]. Quatre fonctions cellulaires majeures sont identifiées : la communication intercellulaire, l'adhésion cellulaire, le développement et les autres fonctions moléculaires dans un quatrième groupe.

Fonction cellulaire	Protéine mutée	Syndrome
<b>Communication intercellulaire</b>	EDA	DEX
	EDAR	DE autosomique
	Connexine 26	Hyperkératose palmo-plantaire-surdité
	Connexine 30	Syndrome de Clouston
	NEMO	Incontinentia Pigmenti
<b>Adhésion cellulaire</b>		DE avec immunodéficience
	PVRL-1	DE type Margarita
	Plakophiline-1	DE avec fragilité cutanée
	P-cadhérine (gène CDH3)	Hypotrichose avec dégénérescence maculaire juvénile
	p63	Syndromes p63
	GATA3	Hypoparathyroïdisme-dysplasie rénale
<b>Développement</b>	Msx1	Syndrome de Withkop
	Shh	SMMCI (Single Median Central Incisor)
<b>Autres fonctions moléculaires</b>	RECQ4	Syndrome de Rothmund-Thomson
	Dyskérine	Dyskeratosis Congenita

**Tableau II** : Principales fonctions cellulaires impliquées dans les DEH et syndromes correspondants [Lamartine, 2003]

Les DEH pures et syndromiques font donc intervenir de nombreuses voies de signalisation moléculaire dont l'EDA-NF-κB. Les classifications clinico-moléculaires permettent une meilleure approche des corrélations entre phénotypes et génotypes. Les anomalies ectodermiques sont associées à un phénotype squelettique dans le cadre de nombreux syndromes au niveau du groupe avec implications squelettiques majeures de la classification de Priolo (2001) et du groupe avec anomalies de l'adhésion cellulaire de Lamartine (2003). Cette association phénotypique suggère la possibilité de manifestations osseuses associées à la DEX, de par les interactions entre morphogenèse ectodermique et ostéogenèse.

### 1.3. EPIDEMIOLOGIE GENETIQUE DE LA DEX ET DES DEH AUTOSOMIQUES

#### 1.3.1 Epidémiologie génétique de la DEX

Les mutations pathogéniques impliquées dans la DEX, peuvent être sporadiques ou familiales et sont distribuées sur l'ensemble des 8 exons du gène *EDA* codant pour l'isoforme EDA-A1, exceptés l'exon 4 et l'exon 2, n'intervenant que dans l'isoforme la plus courte de l'EDA, issue de la maturation post-transcriptionnelle [Ferguson et coll., 1998 ; Vincent et coll., 2001 ; Schneider et coll., 2001 ; Nishibu et coll., 2003 ; Na et coll., 2004 ; Huang et coll., 2006 ; Ramadevi et coll., 2008]. Les mutations sporadiques représentent 11% des mutations du groupe de patients DEX de Vincent et coll. (2001), alors qu'elles sont beaucoup plus nombreuses dans l'étude de Schneider (2001), correspondant à 36% des mutations. Les mutations ne sont pas distribuées aléatoirement, mais localisées préférentiellement sur les exons codant pour les différents sites moléculaires de l'EDA : le site d'homologie TNF extracellulaire, le site de clivage protéolytique furine-dépendant, le site collagène-like et le domaine intracytoplasmique-transmembranaire de l'EDA [Schneider et coll., 2001].

Une forte proportion des mutations affectant le gène *EDA* correspond à des mutations faux-sens, représentant 64% dans l'étude de Vincent (2001). Ces mutations par substitution nucléotidique sont localisées sur l'exon 1, représentant 5,8% des mutations et affectant le domaine transmembranaire de l'EDA-A1 [Vincent et coll., 2001]. Des mutations par substitution nucléotidique ou délétion de l'exon 1 mènent majoritairement à une altération du site d'initiation transcriptionnelle de l'EDA, un frame-shift ou une terminaison prématurée de la transcription de l'EDA [Vincent et coll., 2001 ; Visinoni et coll., 2003].

Les mutations de l'exon 3 (exon 2 selon la séquence référence du gène *EDA* NM\_001399) représentent 25 % des mutations dans l'étude de Vincent (2001) et sont plus fortement représentées dans le groupe de patients DEX de Schneider (2001), dont 60% sont porteurs d'une mutation de l'exon 3 du gène *EDA*. Des mutations récurrentes ont été décrites au niveau des résidus 153-156, de par les répétitions de dinucléotides CpG caractérisant cette région génique [Vincent et coll., 2001 ; Visinoni et coll., 2003] correspondant à la notion de point chaud de mutation au niveau de l'exon 3 du gène *EDA*. La mutation récurrente R156H a été retrouvée dans 26% des cas [Vincent et coll., 2001], R156C étant également récurrente : 11,3% des mutations dans l'étude de Schneider et coll. (2001). Une autre mutation retrouvée fréquemment est la mutation R153C, représentant 9% des cas [Schneider et coll., 2001].



Les mutations par substitution nucléotidique intéressent également le domaine d'homologie TNF de l'EDA-A1, codé par les exons 7-9 (exons 6-8 selon la séquence référence NM\_001399). L'exon 8 est plus fréquemment concerné par les mutations faux-sens (11,7% des mutations dans l'étude de Vincent et 20% dans l'étude de Schneider), comparativement aux exons 7 et 9 du gène EDA. Des mutations faux-sens responsables des modifications protéiques p.Y304C et p.M279R ont été caractérisées récemment au niveau de l'exon 8 du gène EDA [Ramadevi et coll., 2008]. Les mutations de ce domaine TNF ont été associées avec des cas d'expression phénotypique modérée de la DEX consistant en l'absence de manifestations dermatologiques et en une oligodontie modérée [Hashiguchi et coll., 2003].

Les mutations non conservatives H252Y, G269V, F302S et T378M sont localisées au niveau du site fortement conservé des ligands Fas du domaine TNF, impliqué dans la trimérisation de la molécule [Vincent et coll., 2001]. L'exon 9 du gène EDA peut également être affecté par une délétion de 7 pb menant à une mutation frameshift et une terminaison transcriptionnelle prématurée [Lin et coll., 2004].

Le domaine collagène de l'EDA codé par les exons 5 et 6 du locus *ED1* impliqué dans l'homotrimérisation extracellulaire de l'EDA nécessaire à son activité biologique morphogène. De larges mutations de 36 pb menant à la délétion de 4 répétitions collagéniques GLY-X-Y ou des délétions d'un seul nucléotide (Guanine 996 ou 997) ont été associées à des phénotypes sévères de DEX chez les individus mâles atteints [Visinoni et coll., 2003]. La sévérité du phénotype est liée à la perte d'une partie du domaine collagénique de l'EDA tronquée dans sa région extracellulaire avec perte de son potentiel de polymérisation [Visinoni et coll., 2003].

Le domaine intracellulaire et transmembranaire de l'EDA est codé par l'exon 1 impliqué dans les interactions avec le Death-Domain EDARADD. Ces mutations de l'exon 1 sont donc associées à une forme d'EDA extracellulaire tronquée ou une absence d'EDA.

Les mutations par insertion/délétion du gène *EDA* sont plus rares et correspondent à 20% des cas [Lin et coll., 2004]. Les mutations non-sens sont également plus rares (17,6% dans l'étude de Vincent) et ont été décrites notamment au niveau des exons 1, 6, 8 et 9 [Vincent et coll., 2001 ; Tariq et coll., 2007].

### 1.3.2 Épidémiologie génétique des DEH autosomiques

Les gènes codant pour le récepteur EDAR (locus 2q11-q13) et le Death-domain intra-cellulaire EDARADD (locus 1q42.2-q43) sont mutés dans les formes autosomiques dominantes et récessives de DEH [Chassaing et coll., 2006 ; Bal et coll., 2007 ; Tariq et coll., 2007 ; Van der Hout et coll., 2008]. Le taux de mutations *EDA* identifiées chez les patients DEH n'étant que de 27% dans l'étude de Chassaing (2006) et de 57% dans l'étude de Van der Hout (2008), les gènes EDAR-EDARADD sont impliqués dans une proportion considérable de DEH. En effet, Le gène *EDAR* est impliqué dans 25% des DEH non-*ED1* et dans 6.5% de l'ensemble des DEH [Chassaing et coll., 2006]. L'*EDA* active son récepteur EDAR, qui participe avec son Death-domain intra-cellulaire à la mise en place d'un complexe avec les molécules d'adaptation TAB2-TAK1-TRAF6, activant le facteur NF- $\kappa$ B [Morlon et coll., 2005 ; Bal et coll., 2007]. Le gène est constitué de 12 exons et code pour deux domaines moléculaires principaux du récepteur : le Ligand Binding Domain (LDB) et le Death-domain (DD) [Chassaing et coll., 2006]. Le DD intra-cytoplasmique comporte une séquence consensus de liaison aux TNF-Receptor Associated Factors (TRAF), impliqués dans la transduction du signal. Une vingtaine de mutations pathogène ont été identifiées sur le gène *EDAR*, dont 70% de mutations faux-sens distribuées sur les exons 3, 4, 5, 7 et 12 du gène *EDAR* [Monreal et coll., 1999 ; Chassaing et coll., 2006 ; Valcuende-Cavero et coll., 2008 ; Ramadevi et coll., 2008]. La grande majorité des mutations faux-sens affectant le gène *EDAR* (92%) est localisée sur les régions géniques codant pour les domaines fonctionnels LBD et DD du récepteur EDAR [Tariq et coll., 2007]. Une mutation non-sens a été décrite au niveau de l'exon 12 du gène *EDAR*, responsable de la modification protéique p.Arg368X et associée à une forme autosomique dominante de DEH [Lind et coll., 2006]. Une mutation frameshift avec délétion de 4bp, 3 mutations de sites de splicing et une délétion exonique de l'exon 4 du gène EDAR ont été également identifiées [Monreal et coll., 1999]. Une mutation par délétion inframe de l'exon 5 du gène *EDAR* (c.399-404Del) a été identifiée à l'état hétérozygote ; localisée au niveau du LBD extracellulaire dans une région riche en cystéine, elle abolit un pont disulfure, altérant la structure protéique secondaire et par conséquent l'interaction EDA-EDAR [Tariq et coll., 2007].

Des mutations faux-sens ont été identifiées sur le gène EDARADD, responsables des modifications protéiques p.Leu112Arg et et p.Glu142Lys, impliquées respectivement dans des formes autosomiques dominantes et récessives de DEH [Bal et coll., 2007]. La mutation faux-sens G424A du gène *EDARADD*, responsable de la modification protéique Glu142Lys a

été également identifiée dans une famille atteinte de DEH autosomique récessive [Headon et coll., 2001].

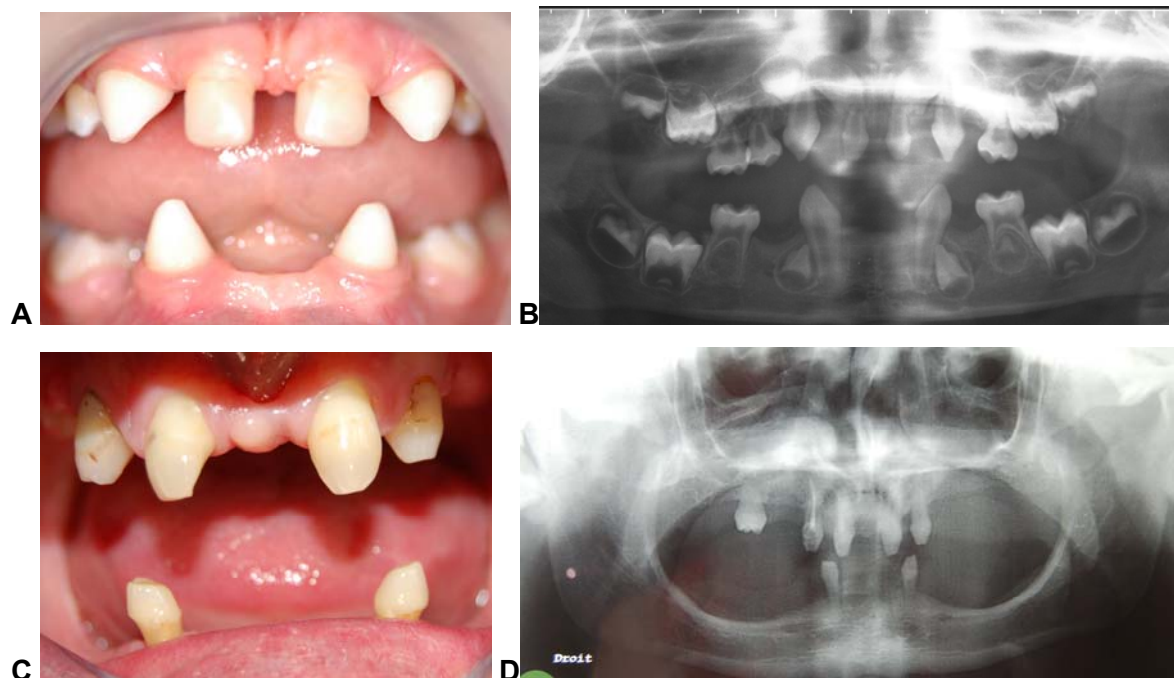
## **1.4 PHENOTYPE DENTAIRE ASSOCIE AUX DEH**

### **1.4.1 Phénotype en denture temporaire**

Les manifestations phénotypiques dentaires associées à la DEX sont représentées par des agénésies dentaires multiples menant à une oligodontie de sévérité variable, voire une anodontie [Crawford et coll., 1991 ; Vierucci et coll., 1994 ; Franchi et coll., 1998 ; Barberia et coll., 2006 ; Yavuz et coll., 2006 ; Acikgoz et coll., 2007 ; Lexner et coll., 2008]. L'oligodontie en denture temporaire est caractérisée par une moyenne de 3,5 agénésies dentaires au niveau maxillaire et de 5,3 agénésies au niveau mandibulaire [Barberia et coll., 2006]. Le phénotype d'oligodontie est donc généralement plus sévère au niveau mandibulaire, ce qui permet un diagnostic différentiel entre l'oligodontie associée à la DEX et les oligodonties non syndromiques avec absence de signes ectodermiques extra-dentaire [Barberia et coll., 2006]. En effet, dans le cadre de ces oligodonties non syndromiques, les agénésies maxillaires (notamment des incisives latérales) sont plus fréquentes [Barberia et coll., 2006].

Les agénésies les plus fréquentes en denture temporaire dans la DEX touchent les incisives centrales et latérales mandibulaires, les incisives latérales maxillaires, les incisives centrales maxillaires et les premières molaires [Vierucci et coll., 1994; Ruhin et coll., 2001 ; Lexner et coll., 2008]. L'anodontie correspond à la manifestation phénotypique dentaire extrême de la DEX [Beliakov et coll., 1998]. L'oligodontie est associée à des dysmorphies coronaires avec des incisives et canines temporaires conoïdes ainsi qu'un taurodontisme des molaires temporaires défini par une augmentation du volume de la chambre pulpaire, des malpositions dentaires et un diastème médian important [Glavina et coll., 2001 ; Lexner et coll., 2007]. Les dysmorphies coronaires en denture temporaire touchent les incisives et canines et consistent en morphologie conoïde et microdontie [Ruhin et coll., 2001 ; Lexner et coll., 2007]. Les molaires temporaires sont également concernées par des anomalies morphologiques coronaires, sous forme de microdontie et modifications de l'organisation cuspidienne [Glavina et coll., 2001]. Les autres manifestations dentaires rencontrées sont une résorption radiculaire pathologique, une absence de rhizalyse avec persistance fréquente des canines et secondes molaires temporaires et des fusions radiculaires [Yavuz et coll., 2006 ; Lexner et coll., 2008]. Les oligodonties en denture temporaire, notamment des incisives mandibulaires, incisives latérales maxillaires et premières molaires doivent donc

être considérées comme un signe clinique d'appel et mener à des examens complémentaires, notamment un examen radiographique panoramique, un examen clinique de la fratrie et des parents et un diagnostic moléculaire par séquençage du gène *ED1* en première intention. La distribution topographique des agénésies dentaires est un élément important, de diagnostic différentiel entre la DEX et une oligodontie non-syndromique [Vastardis et coll., 1996]. En effet, les agénésies d'incisives mandibulaires temporaires et de premières molaires sont plus caractéristiques des oligodonties syndromiques.



**Fig 2** : Aspects cliniques (A et C) et radiologiques (B et D) de l'oligodontie et des dysmorphies coronaires (canines conoïdes) en denture temporaire (A-B) et permanente (C-D).

#### 1.4.2 Phénotype en denture permanente

Le phénotype dentaire comprend une oligodontie, présentant à nouveau une sévérité variable chez les individus mâles atteints, avec une moyenne du nombre d'agénésies située entre 11 et 22 dents manquantes [Barberia et coll., 2006 ; Prager et coll., 2006 ; Lexner et coll., 2007]. L'oligodontie est donc sévère en denture permanente et plus marquée au niveau mandibulaire, avec une moyenne de 7,9 agénésies mandibulaires et 6,8 agénésies maxillaires [Prager et coll., 2006].

Les agénésies les plus prévalentes chez les individus mâles atteints concernent, par ordre de fréquence décroissant, les incisives centrales et latérales mandibulaires, les incisives maxillaires latérales, les prémolaires mandibulaires et maxillaires et les secondes molaires mandibulaires et maxillaires [Prager et coll., 2006 ; Lexner et coll., 2007]. Les dents permanentes les plus fréquemment présentes dans la DEX sont donc les incisives centrales maxillaires, présentes dans 42% des cas, les premières molaires maxillaires et mandibulaires (41% et 39% respectivement), et les canines maxillaires (22%) [Guckes et coll., 1998; Lexner et coll., 2007]. Les mécanismes moléculaires suggérés sont une altération préférentielle par la mutation *EDA* de l'odontogenèse et de l'expression des gènes homéotiques au niveau mandibulaire.

Des anomalies morphologiques dentaires sont rencontrées en denture permanente et consistent en microdontie et dents conoïdes [Ruhin et coll., 2001 ; Lexner et coll., 2007]. Les patients DEX mâles présentent systématiquement des dysmorphies coronaires en denture permanente [Lexner et coll., 2007]. Les anomalies morphologiques radiculaires sont rencontrées dans 30% des cas de DEX [Yavuz et coll., 2006]. Les anomalies radiculaires consistent également en fusion ou morphologie radiculaire *cunéiforme* [Lexner et coll., 2007]. Le taurodontisme, plus fréquent en denture temporaire, est également rencontré dans la DEX en denture permanente, affectant préférentiellement les premières molaires [Jorgenson, 1982 ; Glavina et coll., 2001].

#### **1.4.3 Variabilité phénotypique dentaire et hétérogénéité génétique des DEH**

Une forte variabilité phénotypique dentaire caractérise la DEX, qui est vraisemblablement liée à l'hétérogénéité génotypique avec des mutations du gène *ED1* atteignant l'ensemble des exons et des sites fonctionnels moléculaires de l'*EDA* [Schneider et coll., 2001]. Cette variabilité d'expression phénotypique dentaire caractérisant la DEX concerne aussi bien les patients mâles atteints d'une forme sévère, que les patients de sexe féminin hétérozygote ou homozygote pour la mutation *ED1* [Lexner et coll., 2007].

La variabilité phénotypique est également à mettre en rapport avec la diversité des gènes mutés dans les DEH, en effet les mutations peuvent toucher différents éléments de la voie de signalisation *EDA-EDAR-EDARADD-NF-κB*, respectivement pour les formes liées à l'*X* (*EDA*) [Vincent et coll., 2001], autosomiques dominantes et récessives (*EDAR* et *EDARADD*) [Chassaing et coll., 2006 ; Bal et coll., 2007] et les formes avec immunodéficiences (*NF-κB Essential Modulator : NEMO*) [Smahi et coll., 2002]. Ces mutations, aux conséquences

fonctionnelles différentes sur la voie de signalisation EDA-NF- $\kappa$ B se caractérisent par des phénotypes de sévérité variable [Hashiguchi et coll., 2003].

#### 1.4.4 Corrélations génotype-phénotype dentaire dans la DEX

Des corrélations génotype-phénotype dentaire précises n'ont pas été établies, la difficulté résidant dans ces fortes variabilités phénotypiques et génotypiques [Vincent et coll., 2001; Hashiguchi et coll., 2003, Lexner et coll., 2008]. Néanmoins, certains phénotypes modérés et sévères ont été mis en rapport avec les altérations moléculaires des différents sites fonctionnels de l'EDA [Schneider et coll., 2001 ; Hashiguchi et coll., 2003]. En effet, les mutations du locus *ED1* codant pour l'EDA sont situées sur les exons codant pour les différents sites moléculaires de l'EDA :

- **Le site d'homologie TNF** extracellulaire codé par les exons 7, 8 et 9 impliqué dans l'interaction spécifique EDA-Ectodysplasine Receptor (EDAR). La mutation de ce domaine TNF a été associée à des cas d'expression phénotypique modérée de la DEX consistant en l'absence de manifestations dermatologiques et en une oligodontie légère [Hashiguchi et coll., 2003]. Des phénotypes sévères sur le plan dermatologique et dentaire ont été également décrits en association avec des mutations du domaine TNF de l'EDA-A1 [Tariq et coll., 2008]. Ces expressions phénotypiques peuvent être liées à la nature de la mutation. Ainsi, une mutation avec perte du site de terminaison transcriptionnelle semble être associée à une forme moins sévère de DEX, par rapport aux mutations de l'exon 1 avec perte du site d'initiation transcriptionnelle [Vincent et coll., 2001].
- **Le domaine collagène** de l'EDA codé par les exons 5 et 6 du locus *ED1* impliqué dans l'homotrimérisation extracellulaire de l'EDA nécessaire à son activité biologique morphogène. De larges mutations de 36 pb menant à la délétion de 4 répétitions collagéniques GLY-X-Y ou des délétions d'un seul nucléotide (Guanine 996 ou 997) ont été associées à des phénotypes sévères de DEX chez les individus mâles atteints [Visinoni et coll., 2003]. La sévérité du phénotype est liée à la perte d'une partie du domaine collagénique de l'EDA tronquée dans sa région extracellulaire avec perte de son potentiel de polymérisation [Visinoni et coll., 2003].
- **Le site de clivage protéolytique furin-dépendant de l'EDA** : codé par l'exon 3 correspondant à un point chaud de mutation avec 25% des formes *ED1* de DEH liées à une mutation de l'exon 3 [Vincent et coll., 2001]. L'exon 3 code pour la séquence consensus de clivage protéolytique par l'enzyme Furine Arg-X-Lys/Arg-Arg dont les Arg 155 et Arg 156

sont mutées préférentiellement avec une prévalence respective de 19% et 5% [Visinoni et coll., 2003]. Cette région génique du locus *ED1* est riche en *dinucléotides C-G*, caractérisés par un taux de mutation plus élevé que les autres séquences dinucléotidiques [Visinoni et coll., 2003]. Des mutations par substitution nucléotidique de l'exon 3 ont été associées à des phénotypes sévères de DEX [Visinoni et coll., 2003].

- **Le domaine intracellulaire et transmembranaire de l'EDA** : codé par l'exon 1 impliqué dans les interactions avec le Death-Domain EDARADD. Des mutations par substitution nucléotidique ou délétion de l'exon 1 ont été décrites et mènent majoritairement à une altération du site d'initiation transcriptionnelle de l'EDA, un frame-shift ou une terminaison prématurée de la transcription de l'EDA [Vincent et coll., 2001 ; Visinoni et coll., 2003]. Ces mutations de l'exon 1 sont donc associées à une forme d'EDA extracellulaire tronquée ou une absence d'EDA et devrait donc mener à un phénotype de DEX sévère.

Une analyse précise de l'expression phénotypique dentaire de la mutation *EDA* et une mise en corrélation avec l'exon du gène *EDA* muté et les fonctions moléculaires altérées de l'EDA-A1 permettraient une meilleure compréhension des relations entre manifestations phénotypiques dentaires de la DEX et type de mutation.

#### **1.4.5 Phénotype dentaire associé aux femmes vectrices hétérozygotes pour la mutation *EDA***

Les femmes vectrices hétérozygotes sont caractérisées par une expression phénotypique dentaire modérée consistant en une hypodontie ou légère oligodontie, des anomalies morphologiques coronaires et une microdontie des premières molaires permanentes [Lexner et coll., 2008] (Fig 3). Ces signes cliniques dentaires constituent un signe prédictif de la présence de la mutation *EDA* et sont donc particulièrement pertinents dans le cadre de la détection des femmes hétérozygotes et le conseil génétique. Un nombre d'agénésies dentaires entre 1 et 7 a été décrit pour les femmes hétérozygotes, concernant particulièrement les incisives latérales maxillaires ainsi que les incisives mandibulaires et premières molaires [Cambiaghi et coll., 2000]. Un phénotype dentaire modéré avec un nombre d'agénésie compris entre 0 et 9 a été décrit par Lexner (2008) avec une moyenne de 2,86 agénésies dentaires en denture permanente [Lexner et coll., 2008]. Les femmes vectrices caractérisées par un tableau clinique d'oligodontie plus sévère (17 et 20 agénésies) présentent une inactivation du chromosome X non pathologique [Lexner et coll., 2008]. De plus des anomalies des relations squelettiques sagittales ont été également observées chez les femmes hétérozygotes pour la mutation *EDA* [Lexner et coll., 2008]. Le phénotype

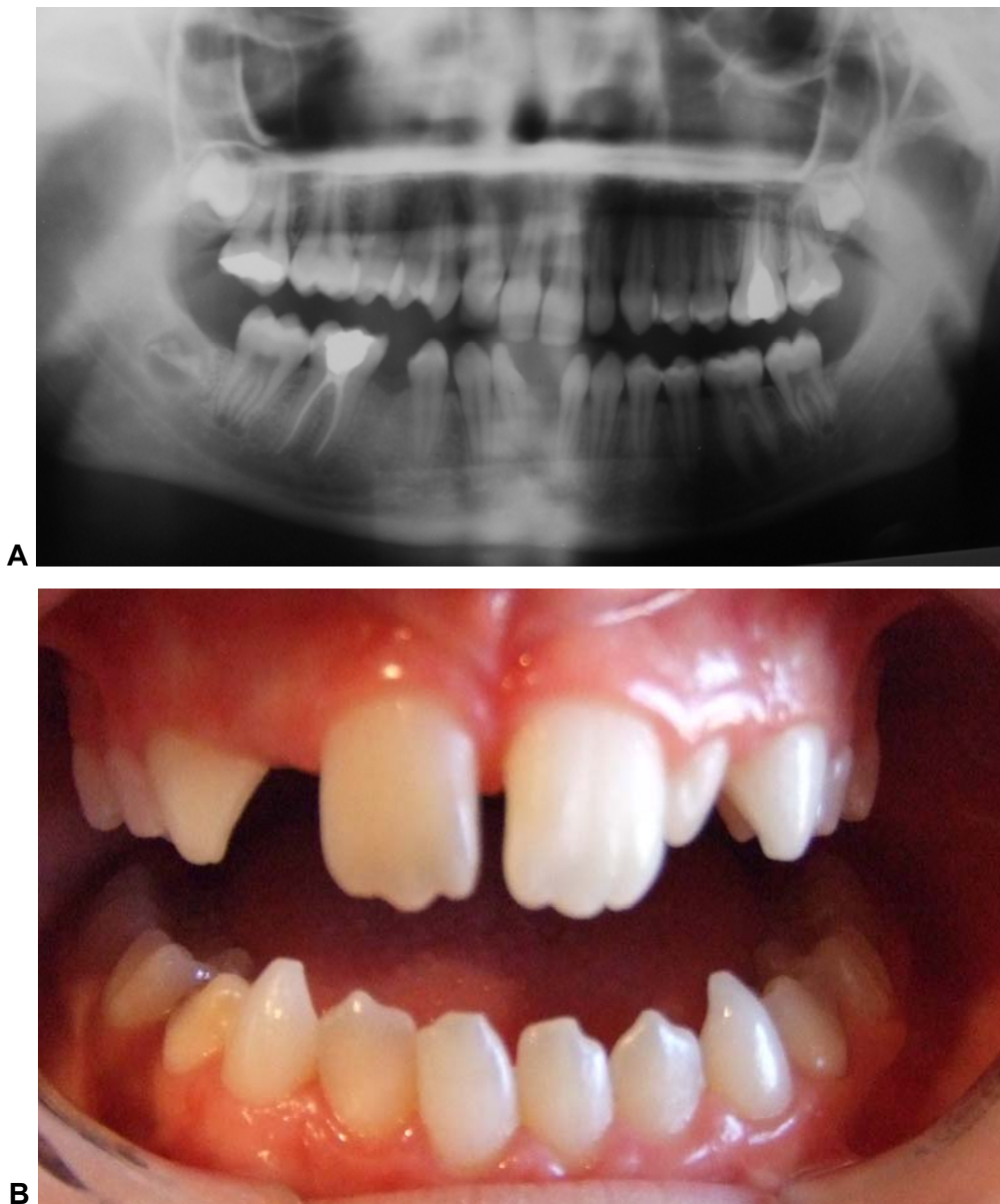
modéré distingue les femmes hétérozygotes pour la mutation *EDA* des femmes homozygotes caractérisées par un phénotype d'oligodontie sévère [Settineri et coll., 1976].

Les dysmorphies coronaires concernent les incisives centrales et latérales, ainsi que les canines et peuvent correspondre à des dents conoïdes, principalement pour les incisives mandibulaires, ou de morphologie atypique [Lexner et coll., 2007]. Une réduction de la dimension mésio-distale des dents est également observée chez les femmes hétérozygotes, aussi bien pour les dents antérieures que postérieures, cette microdontie relative étant plus marquée au niveau mandibulaire [Lexner et coll., 2007].

Une autre manifestation phénotypique est le retard d'éruption des dents permanentes, qui est un élément diagnostique permettant d'orienter le diagnostic et l'identification de la présence de la mutation *EDA* [Lexner et coll., 2007]. Les anomalies morphologiques radiculaires telles qu'une fusion ou une anatomie cunéiforme sont également caractérisées par une prévalence plus importante chez les femmes hétérozygotes, ainsi que le taurodontisme. [Lexner et coll., 2007].

L'ensemble de ces manifestations phénotypiques dentaires associé aux femmes hétérozygotes pour la mutation *EDA* doit donc être considéré comme un bio-marqueur permettant l'identification des femmes vectrices.





**Fig 3 :** (A) Aspect radiographique du phénotype dentaire d'une femme vectrice hétérozygote pour la mutation *EDA*, avec agénésies des incisives centrales mandibulaires et de l'incisive latérale maxillaire gauche.

(B) Aspect clinique du phénotype dentaire d'une patiente hétérozygote pour la mutation *EDA* avec dysmorphies coronaires des incisives et canines permanentes mandibulaires associées à un retard d'éruption de l'incisive latérale droite maxillaire permanente.

## 1.5 PHENOTYPE ASSOCIE AUX FORMES AUTOSOMIQUES DOMINANTES ET RECESSIVES DE DEH

Les DEH autosomiques dominantes et récessives sont liées à des mutations des loci *EDAR* et *EDARADD*, la mutation du gène *EDAR* étant plus fréquente et correspond à 25% des cas de DEH non-*EDA* [Chassaing et coll., 2006 ; Lind et coll., 2006 ; Bal et coll., 2007]. Les mutations du gène *EDAR* sont distribuées sur l'ensemble des 12 exons du gène, menant également à une forte variabilité génotypique associée aux formes autosomiques de DEH [Monreal et coll., 1999 ; Chassaing et coll., 2006]. Néanmoins, les mutations sont localisées au niveau de sites fonctionnelles du récepteur EDAR, le site « Ligand Binding Protein » (LBD) impliqué dans l'interaction EDA-A1-EDAR et le site « Death-Domain » (DD) intervenant dans l'activation de la voie NF- $\kappa$ B [Chassaing et coll., 2006]. Ainsi, des mutations par substitution nucléotidique du site LBD, retrouvées dans les DEH autosomiques, entraînent *in-vitro* une réduction de la liaison de l'isoforme EDA-A1 à son récepteur EDAR [Schneider et coll., 2001]. Des mutations faux-sens ou par délétion du site DD entraînent, quant à elle, une réduction *in-vitro* de l'activation de NF- $\kappa$ B [Kumar et coll., 2001]. Un phénomène de concentration des mutations au niveau des exons codant pour les sites LBD et DD est observé ; respectivement exons 3, 4 et 5 pour le site LBD et exons 12 pour le site DD [Chassaing et coll., 2006].

Des corrélations génotype-phénotype ont été décrites suggérant des phénotypes plus sévères sur le plan dermatologique, crânio-facial et dentaire pour les formes autosomiques récessives que dominantes [Chassaing et coll., 2006]. En effet, les individus présentant deux mutations dans les formes autosomiques récessives présentent une anhidrose avec une oligodontie plus sévère [Chassaing et coll., 2006]. La variabilité d'expression phénotypique est plus marquée dans les formes autosomiques dominantes [Chassaing et coll., 2006].

Un phénotype dentaire d'oligodontie modérée et d'anomalies morphologiques coronaires a été décrit dans une forme autosomique dominante de DEH chez 32 individus [Aswegan et coll., 1997]. Un phénotype d'oligodontie plus sévère, avec 10 agénésies en denture temporaire et 11 agénésies en denture permanente, a été décrit dans une famille atteinte de DEH autosomique dominante liée à une mutation non-sens de l'exon 12 du gène *EDAR* [Lind et coll., 2006]. La variabilité du phénotype dentaire observée dans la DEH autosomique est vraisemblablement liée à la variabilité génétique avec des mutations touchant les différents exons du gène *EDAR* [Lind et coll., 2006]. Des phénotypes plus sévères, sur le plan dentaire et dermatologique, ont été également observés dans la DEH autosomique dominante, liée à des mutations entraînant des altérations fonctionnelles plus importantes de

voie EDA-EDAR. Les agénésies concernant préférentiellement les incisives permanentes mandibulaires sont caractérisées par une distribution topographique différente à la DEX pour les autres localisations, avec une atteinte des incisives, canines et prémolaires [Aswegan et coll., 1997 ; Lind et coll., 2006]. En effet, les canines maxillaires sont des dents relativement respectées par l'oligodontie dans le cadre de la DEX et plus sujettes aux agénésies dans les formes autosomiques de DEH [Aswegan et coll., 1997 ; Lexner et coll., 2006]. Les dysmorphies coronaires sont systématiquement rencontrées au niveau des incisives temporaires dans les formes autosomiques de DEH [Aswegan et coll., 1997].

## **1.6 PHENOTYPE CRANIO-FACIAL ASSOCIE AUX DEH**

### **1.6.1 Phénotype crânio-facial associé à la DEX**

Des études céphalométriques et anthropométriques de patients DEH ont montré une réduction généralisée des dimensions faciales, particulièrement marquée au niveau des hauteurs faciales et du tiers médian de la face, en rapport avec une hypoplasie maxillaire [Saksena et coll., 1990; Boj et coll., 1993 ; Johnson et coll., 2002 ; Skrinjaric et coll., 2003 ; Alcan et coll., 2006 ].

Des manifestations phénotypiques squelettiques crânio-faciales sont associées à la DEX et semblent être corrélées à la sévérité de l'oligodontie [Johnson et coll., 2002]. Les principaux éléments dysmorphiques crânio-faciaux observés sont une hypoplasie maxillaire, un prognathisme mandibulaire et une proéminence frontale menant à une concavité faciale importante dans le plan sagittal [Ruhin et coll., 2001; Johnson et coll., 2002 ; Yavuz et coll., 2006 ; Dellavia et coll., 2006; Arslan et coll., 2007]. Une progénie peut également être associée au tableau clinique [Ruhin et coll., 2001].

Une rétrognathie maxillaire dans le plan sagittal est également associée à la DEX, et s'inscrit dans un tableau clinique d'hypoplasie du tiers médian de la face [Johnson et coll., 2002]. Une altération de la croissance squelettique antéro-postérieure du complexe maxillaire est donc observée. Néanmoins, un suivi longitudinal céphalométrique d'un important groupe de 61 patients DEX a montré une forte variabilité inter-individuelle des positions sagittales du maxillaire et de la mandibule, correspondant à une variabilité d'expression phénotypique crânio-faciale de la DEX [Bondarets et coll., 2002]. Une évolution des relations squelettiques sagittales entre le maxillaire et la mandibule durant la croissance crânio-faciale a été

montrée, avec la réduction progressive de l'angle (ANB) et la mise en place progressive d'une classe III squelettique [Bondarets et coll., 2002].

L'oligodontie mène également à une forte réduction des hauteurs faciales, que ce soit la hauteur faciale inférieure ou la hauteur faciale totale [Johnson et coll., 2002 ; Yavuz et coll., 2006]. La réduction de la hauteur faciale inférieure est également associée à une altération de la croissance de la hauteur faciale antérieure par rapport à la hauteur faciale postérieure, menant à la mise en place d'un profil hypo-divergent [Bondarets et coll., 2002]. L'orientation du maxillaire par rapport à la base du crâne est modifiée et caractérisée par une fermeture de l'angle entre le plan maxillaire et la base du crâne [Johnson et coll., 2002]. Les caractéristiques mandibulaires sont une réduction de la longueur du corps mandibulaire, malgré le prognathisme, ainsi qu'une réduction significative de la hauteur du ramus mandibulaire [Johnson et coll., 2002].

La base du crâne est également affectée avec une réduction de la longueur antérieure de la base crâne, une augmentation dans le plan sagittal de la base du crâne postérieure et une augmentation de la flexion basi-crânienne [Johnson et coll., 2002]. Une aplasie du vertex crânien, correspondant à une altération de la croissance crânio-faciale, a également été observée [Ruhin et coll., 2001]. D'autres manifestations phénotypiques crânio-faciales sont également associées à la DEX comme un élargissement de l'ensellure nasale avec une éventuelle atrésie alaire et une morphologie nasale pyriforme, ainsi qu'un philtrum élargi [Ruhin et coll., 2001].

Des approches anthropométriques analysant les caractéristiques des tissus mous faciaux de patients DEH permettent une analyse non-invasive tri-dimensionnelle et prenant en compte l'ensemble des structures faciales [Ferrario et coll., 2004 ; Dellavia et coll., 2008]. Ces mesures anthropométriques se basent sur une technique de numérisation électromagnétique de la face, de détermination des coordonnées tri-dimensionnelles des repères anatomiques faciaux et de comparaison par rapport à des modèles géométriques du massif crânio-facial [Ferrario et coll., 2003]. Des analyses surfaciques et volumiques des lèvres, du nez, des oreilles et de la région oculaire sont réalisées et comparées à des données témoins [Ferrario et coll., 2003].

Les principales modifications anthropométriques faciales retrouvées correspondent à augmentation de la surface labiale, en rapport avec l'éversion labiale, ainsi qu'une réduction de la surface orbitaire et nasale [Ferrario et coll., 2003], associées à une réduction des hauteurs faciales et des dimensions antéro-postérieures des 2/3 inférieures de la face [Ward

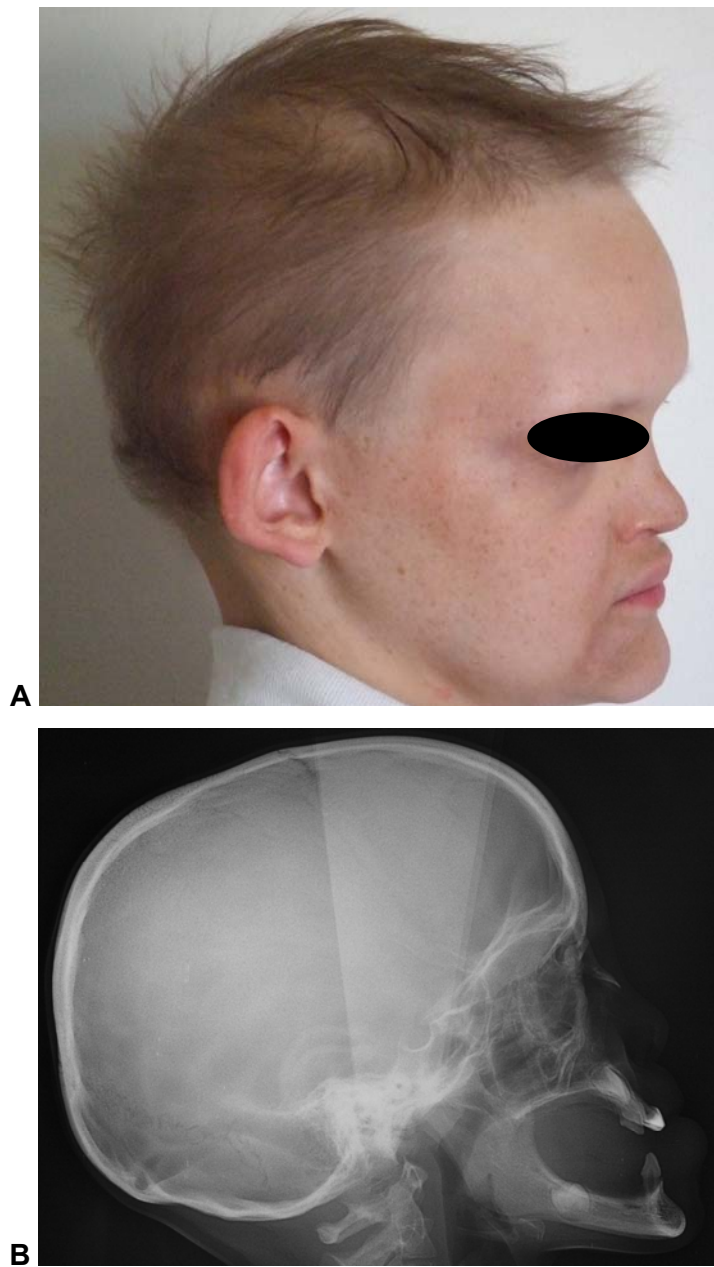
et coll., 1987]. Une réduction globale de la croissance faciale et un retard de 2 ans des pics de croissance maxillaire et mandibulaire ont été décrits par ces méthodes anthropométriques non-invasives [Dellavia et coll., 2008].

L'ensemble des structures squelettiques crânio-faciales semble donc être altéré par la mutation de l'EDA, confirmant l'implication de la voie EDA-NF- $\kappa$ B dans le développement crânio-facial. En effet, le facteur EDA est exprimé durant le développement embryonnaire crânio-facial au niveau des ostéoblastes du crâne, de la mandibule et du cartilage de Meckel [Tucker et coll., 2000].

**Néanmoins, des corrélations génotype-phénotype crânio-facial n'ont pas été établies entre les fonctions moléculaires de l'EDA altérées et l'expression phénotypique au niveau du complexe crânio-facial de la mutation *ED1*.**

### **1.6.2 Phénotype crânio-facial associé aux formes autosomiques de DEH**

Une variabilité phénotypique crânio-faciale, plus importante dans les formes autosomiques dominantes de DEH, est observée et liée à la variabilité génétique avec des mutations localisées sur différents exons des gènes EDAR et EDARADD [Chassaing et coll., 2006]. Le phénotype crânio-facial est plus sévère dans les formes autosomiques récessives [Chassaing et coll., 2006]. Les manifestations décrites pour les formes autosomiques dominantes sont une hypoplasie zygomatique et une proéminence frontale modérée, avec une dysmorphie crânio-faciale peu accentuée [Aswegan et coll., 1997].



**Fig 4** : Aspects cliniques (A) et téléradiographique (B) de la dysmorphie crânio-faciale associée à une mutation faux-sens c. 1048 G>T de l'exon 8 du gène *EDA* : profil facial concave, proéminence frontale, hypoplasie maxillaire, progénie.

## **1.7 EXTENSION DU SPECTRE PHENOTYPIQUE : MANIFESTATIONS OSSEUSES ASSOCIEES A LA DEX**

Des modifications structurales et métaboliques osseuses ont été décrites dans la DEX et suggèrent l'existence d'un phénotype osseux associé à la mutation *EDA* [Ruhin et coll., 2001; Soderholm et coll., 1985 ; Hill et coll., 2002].

En effet, une déminéralisation osseuse diffuse a été observée chez un patient DEX et une anomalie mésectodermique, liée aux altérations de l'*EDA*, menant à une modification osseuse qualitative et quantitative a été suggérée [Ruhin et coll., 2001]. En effet, la mutation de l'*EDA* entraîne une dyshistogenèse ectodermique, pouvant altérer les interactions entre ectoderme et mésoderme. Des anomalies de la pneumatisation crânio-faciale ont été également rapportées, avec des patients DEX présentant des sinus maxillaires hypotrophiques et hypertrophiques [Ruhin et coll., 2001].

Une altération du métabolisme osseux, avec une réduction significative des taux plasmatiques d'hormone parathyroïdienne (PTH), a été observée chez six patients DEX et leur mère vectrice hétérozygotes pour la mutation *EDA* [Söderholm et coll., 1985]. La PTH est un élément endocrinien essentiel de la régulation du métabolisme osseux et phosphocalcique, ainsi que de l'activation ostéoclastique [Fu et coll., 2002]. En effet, les principales fonctions physiologiques de la PTH sont une augmentation des taux plasmatiques de calcium, *via* une stimulation de la différenciation et de l'activation ostéoclastique, ainsi qu'une stimulation de l'absorption intestinale de calcium. La PTH stimule l'activité de résorption osseuse ostéoclastique, *via* une activation de la voie de signalisation RANKL, qui est une cytokine ostéoclastogénique majeure [Fu et coll., 2002; Bezerra et coll., 2005].

La PTH limite également l'excrétion rénale de calcium, *via* une augmentation de la réabsorption tubulaire de calcium.

**Une baisse des taux plasmatiques de PTH associée à la DEX pourrait donc être à l'origine d'anomalies du métabolisme osseux et des processus de différenciation ostéoclastique** [Soderholm et coll., 1985].

---

## **2. LA VOIE DE TRANSDUCTION *EDA-TRAF-IKK-NF-kB* : FONCTIONS MOLECULAIRES ET IMPLICATIONS DANS LE PHENOTYPE OSSEUX**

---

### **2.1 STRUCTURE MOLECULAIRE ET ORGANISATION GENOMIQUE DE L'ECTODYSPLASINE (EDA)**

#### **2.1.1 Gène *EDA***

Le gène *EDA* code pour l'ectodysplasine (EDA), facteur morphogène épithélial de la superfamille des Ligands Tumor Necrosis Factor (TNF) [Kere et coll., 1996 ; Schneider et coll., 2001]. L'organisation génomique du gène *EDA* est caractérisée par la présence de 12 exons, dont 9 codent pour l'isoforme biologiquement active *EDA-A1* par un mécanisme de splicing alternatif. Après une première étape de cartographie génétique par clonage positionnel en 1996 [Kere et coll., 1996], l'identification du gène de l'*EDA* et de son organisation génomique est réalisée grâce à des techniques d'hybridation *in situ* et de Northern-blot visant l'identification de l'ARNm *EDA* au niveau tissulaire [Srivastava et coll., 1997]. Le transcrite le plus long correspond à l'isoforme *EDA-A1*, d'une taille de 6kb, codant pour une protéine transmembranaire de 391 acides-aminés [Mikkola et coll., 1999]. Néanmoins il existe pour l'*EDA* des transcrits alternatifs. En effet, des ARNm *EDA* de poids moléculaires différents sont identifiés, ce qui correspond à des épissages alternatifs durant la transcription du gène [Bayès et coll., 1998]. Ces transcrits alternatifs sont identiques au niveau de l'exon 1 et des régions codant pour les domaines intracellulaires et transmembranaires, mais ils diffèrent au niveau de leur région extracellulaire. Un criblage d'une banque de cDNA foetal cérébral par hybridation avec une sonde correspondant au cDNA complet de l'isoforme *Ta-A* a permis l'identification de 9 clones différents de cDNA de l'*EDA* correspondant à des transcrits alternatifs, dont l'*EDA-A1*, interagissant avec le récepteur *EDAR* et l'*EDA-O*, qui est l'isoforme la plus courte [Bayès et coll., 1998]. L'étude de l'expression tissulaire des différents transcrits de l'*EDA* se fait par PCR appliquée sur des banques de cDNA provenant de 8 tissus différents, ce qui a permis l'identification de 8 différents transcrits alternatifs de l'*EDA*, dont les isoformes l'*EDA-A1*, l'*EDA-O* et l'*EDA-B* au niveau des tissus humains cérébraux, myocardiques, rénaux, hépatiques, pulmonaires, placentaires et musculaires [Bayès et coll., 1998].

L'isoforme *EDA-A1* interagit de manière spécifique avec le récepteur Ectodysplasin Receptor (*EDAR*), ce qui a été montré par des expériences d'immunoprécipitation dans lesquelles une



forme recombinante soluble d'EDA-A1 précipite avec le Récepteur EDAR, le complexe EDA-EDAR étant analysé par Western-Blot [Schneider et coll., 2001]. La présence de 2 poids moléculaires différents d'EDA lors de la migration électrophorétique démontre l'existence de sites de glycosylation au niveau de l'EDA. Les mêmes expériences d'immunoprécipitation démontrent l'interaction spécifique entre l'isoforme EDA-A2, issue du splicing alternatif et XEDAR (X-linked Ectodysplasin Receptor), et non pas EDAR. De façon intéressante, l'utilisation de récepteur EDAR recombinant muté avec différentes mutations détectées dans les formes autosomiques de Dysplasie Ectodermique Hypohidrotique (DEH) abolit ou réduit considérablement la liaison EDA-EDAR et donc sa détection par Western-Blot [Schneider et coll., 2001].

Ces résultats expérimentaux montrent l'importance de l'interaction moléculaire EDA-EDAR menant à l'activation du facteur transcriptionnel NF- $\kappa$ B nécessaire à de nombreuses réponses immunitaires, inflammatoires ou morphogènes, médiant ainsi l'activité biologique de l'EDA durant l'embryogenèse [Cui et coll., 2002 ; Mikkola et coll., 2003]. Les mutations du gène *ED1*, impliquées dans le phénotype de DEX sont localisées au niveau d'exons codant pour les sites fonctionnels importants de l'EDA en l'occurrence le site d'homologie TNF codé par les exons 7, 8 et 8, le site collagène-like (exon 5) et le site de clivage protéolytique furine-dépendant (exon 3) constituant un point chaud de mutation [Schneider et coll., 2001 ; Vincent et coll., 2001]. Une forte hétérogénéité génotypique est donc associée à la DEX et est à l'origine de la variabilité d'expression phénotypique du syndrome.

Le clonage du cDNA de l'EDA a permis la production de la molécule recombinante par transfection cellulaire [Ezer et coll., 1999], et l'analyse de ses fonctions moléculaires. Ainsi l'EDA recombinante exprimée dans une lignée cellulaire présente un poids moléculaire de 43-46 kda [Mikkola et coll., 1999 ; Schneider et coll., 2001] et est colocalisé au niveau des structures cytosquelettiques des régions cellulaires latéro-apicales [Ezer et coll., 1999]. L'EDA est une molécule oligomérique glycosylée de type II, c'est-à-dire présentant sa partie N-terminale au niveau intracellulaire. L'EDA présente un site extracellulaire similaire aux ligands de la famille TNF, site fonctionnel impliqué dans les interactions moléculaires spécifiques EDA-EDAR [Ezer et coll. 1999]. L'EDA est une molécule appartenant à la famille TNF, présentant une analogie de séquence avec le TNF $\alpha$ , la lymphotoxine  $\alpha$  et le ligand Fas [Mikkola et coll., 1999].

### 2.1.2 Gène *Ta*

Le gène *Ta* équivalent du gène humain EDA, a été identifié par hybridation d'une librairie génomique murine  $\lambda$ , en utilisant l'exon 1 du gène de l'EDA [Srivastava et coll., 1997]. L'identité du gène a été confirmée par PCR-séquençage et par une forte hybridation avec la sonde EDA. Ferguson et coll., ont également réalisé une amplification par PCR, à partir d'une banque génomique de cDNA murine provenant d'un prélèvement à 17 jours de développement embryonnaire. Le gène murin *Ta* fait également l'objet d'un épissage alternatif, produisant différentes isoformes, tout comme pour le gène de l'EDA [Mikkola et coll., 1999]. En effet, le criblage d'une banque génomique de cDNA embryonnaire murine a permis l'identification de 2 isoformes différentes du cDNA *Ta*, l'isoforme Ta-A2 d'une longueur de 5kb, et l'isoforme TA-A3 de 3kb. Ces 2 isoformes se rajoutent à celle identifiée par Ferguson et coll., nommée Ta-A4 de 1.5kb. TA-A1 est l'isoforme la plus longue, codant pour une protéine fonctionnelle de 391 aa, [Srivastava et coll.,1997]. Ces isoformes du cDNA *Ta* sont également appelées Ta A, Ta B et Ta C et l'alignement complet des séquences des transcrits Ta, Ta B et Ta C avec la séquence du gène codant pour l'EDA a permis l'identification de l'organisation génomique du gène *Ta* et des lésions moléculaires caractérisant les différentes lignées murines Tabby [Srivastava et coll., 1997]. L'exon 1 est commun aux gènes EDA et TA [Srivastava et coll., 1997]. L'exon 2 du gène *EDA*, correspondant à une séquence de 218 bp n'est pas retrouvé au niveau du gène *Ta*. La séquence codante de 106bp localisée immédiatement en 5' de l'exon 1, commune aux isoformes Ta-B et Ta-C correspond donc à l'exon 3 du gène *Ta*. Les exons 4 et 5 du gène *Ta* ont été détectés uniquement au niveau du transcrit de l'isoforme Ta-A et correspondent à une séquence codante de 674 bp [Srivastava et coll., 1997]. L'analyse par Northern Blot durant le développement embryonnaire de l'expression des différents transcrits du gène *Ta* en utilisant une sonde correspondant à l'exon 1 a montré une expression bi-phasique des ARNm *Ta* [Srivastava et coll., 1997]. En effet, une expression de faible niveau d'un ARNm *Ta* de 4,5 kb a été décrite à ED 7J, suivie de l'expression de transcrits *Ta* de 5,5 et 6 kb à ED 11, 15 et 17J [Srivastava et coll., 1997]. De faibles taux de transcrits mineurs de 1,8 kb, 2 kb et 2,4 kb ont été également détectés [Srivastava et coll., 1997]. Ces différents transcrits du gène *Ta* montrent l'existence d'un phénomène de régulation transcriptionnelle durant le développement embryonnaire menant à l'expression de différentes isoformes (Ta A, Ta B et Ta C) pouvant avoir des fonctions moléculaires différentes. Cela est à mettre en parallèle avec l'existence de différentes isoformes de l'EDA, EDA-A1 et EDA-A2 ayant des voies de signalisation respectivement via EDAR et XEDAR (X-linked Ectodysplasin Receptor) et des fonctions moléculaires distinctes.

Différents types de lésions moléculaires ont été identifiés, correspondant à une variabilité génotypique associée à la DEX, aussi bien au niveau du modèle Tabby que chez l'homme. L'amplification des exons 1, 3 et 5 du gène *Ta* de chaque lignée Tabby par PCR et la migration électrophorétique des produits de PCR a montré une délétion spécifique de l'exon 1 au niveau d'une séquence STS codant pour les 132 premiers résidus du facteur Ta [Srivastava et coll., 1997]. Cette large délétion nucléotidique mène à une altération des fonctions moléculaires du facteur Ta et au phénotype de DEH observé au niveau de la lignée Tabby concernée par cette mutation.

Une autre mutation a été détectée par analyse après digestion endonucléasique des produits PCR des exons 1 et 3 [Srivastava et coll., 1997]. Une modification de la mobilité d'un fragment spécifique de l'exon 1 a été confirmée par séquençage révélant une délétion mono-nucléotidique en position + 550 de l'exon 1 du gène *Ta*. Cette délétion mène à un Frameshift, une terminaison transcriptionnelle prématurée du gène Ta et un facteur Ta tronqué [Srivastava et coll., 1997].

### **2.1.3 Structure moléculaire de l'EDA**

La famille TNF est impliquée dans les mécanismes immunitaires, inflammatoires, carcinogéniques, anti-apoptotiques mais également dans la survie cellulaire endothéliale et la différenciation ostéoclastique [Gravallese et coll. 2001 ; Smahi et coll., 2002 ; Gaur et coll., 2003].

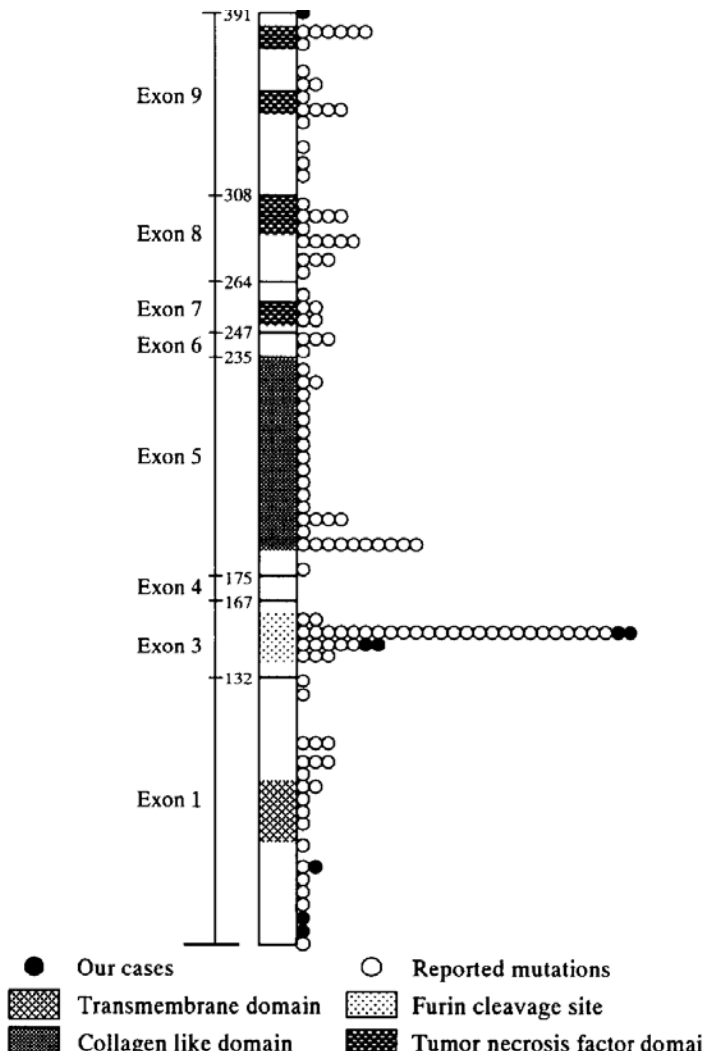
Le site d'homologie TNF de l'EDA est muté et associé à des phénotypes de sévérité variable de DEX, liés à une altération de l'interaction EDA-EDAR [Bayès et coll., 1998]. L'expression d'EDA recombinante mutée au niveau de différents nucléotides des exons 7, 8 et 9 codant pour le site TNF a montré une altération complète ou partielle pour la mutation EDA-A1 S374R de l'interaction et de la formation du complexe macro-moléculaire EDA-EDAR [Schneider et coll., 2001].

Les mutations sur le domaine TNF de l'EDA sont également associées à des phénotypes d'hypodontie incisives dominantes liées à l'X [Tarpey et coll., 2007]. Le phénotype observé consiste principalement en agénésies d'incisives mandibulaires et d'incisives maxillaires latérales en dentures primaire et permanente sans phénotype cutané-phanérien, crânio-facial et d'hypohidrose exceptée une légère hypotrichose pour certains individus [Tarpey et coll., 2007].

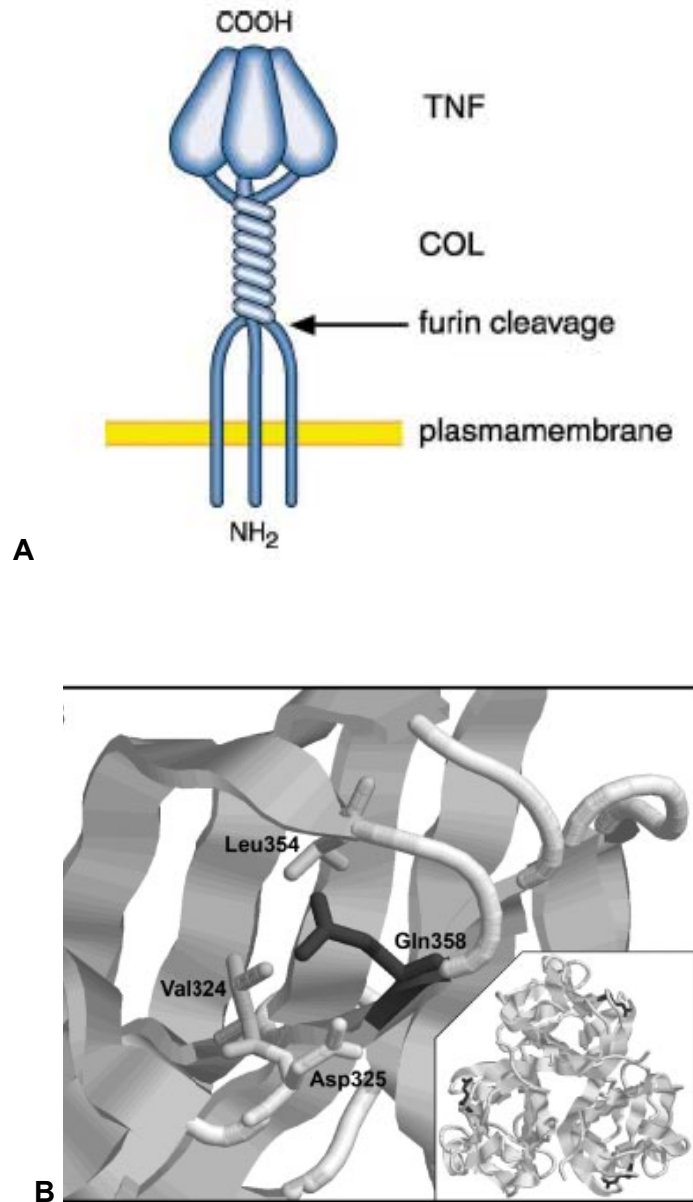
Le site Collagen-like permet l'homo-trimérisation de l'EDA [Ezer et coll., 1999; Mikkola et coll., 2003]. Une structure collagénique correspond à une séquence répétitive contenant l'acide aminé glycine [Ezer et coll., 1999]. Son potentiel de polymérisation a été étudié par transfection cellulaire du cDNA EDA et analyse des poids moléculaires des oligomères sécrétés dans le milieu de culture. La transfection d'un cDNA tronqué au niveau du domaine collagénique, ou du domaine C-terminal n'a pas permis de retrouver par Western-Blot la structure trimérique. De même, la transfection cellulaire de l'isoforme courte EDA-O ne donne pas lieu à l'homo-trimérisation de l'EDA dans le milieu de culture cellulaire [Ezer et coll., 1999]. Les mutations au niveau de l'exon 5 du gène *ED1*, sont également associées à des phénotypes de DEX, ce qui montre l'importance fonctionnelle du site collagène de l'EDA et de son homo-trimérisation dans l'expression de son activité biologique morphogène. L'utilisation d'EDA recombinante mutée au niveau de différents résidus du site collagénique a permis de montrer que l'EDA présente une immuno-précipitation avec EDAR et détectée par Western-Blot malgré la mutation ou la délétion du site collagénique [Schneider et coll., 2001]. Le site collagénique n'intervient donc pas dans l'interaction moléculaire EDA-EDAR mais dans l'homo-trimérisation de la molécule.

Un site de clivage protéolytique Furine-dépendant est nécessaire à la libération dans le milieu extracellulaire de la molécule et donc à son activité biologique morphogène [Elomaa et coll., 2001]. En effet, l'EDA intervient dans la morphogénèse épithéliale des dérivés ectodermiques en médiant des interactions épithélio-mésenchymateuses [Mikkola et coll., 1999]. La furine est une enzyme à activité protéasique appartenant à la famille des « Pro-protein Convertases Subtilisin-like » (SPC) intervenant dans le clivage de facteurs de croissance, d'hormones ou de molécules d'adhésion [Elomaa et coll., 2001]. La localisation du site de clivage protéolytique a été étudiée grâce à différentes constructions plasmidiques, avec des cDNA tronqués en différentes zones du gène. En effet, des cDNA tronqués en différentes régions de l'espaceur entre le domaine collagénique et le domaine transmembranaire ont été utilisés. L'analyse par « Western-Blot » de la présence d'EDA soluble dans le milieu de culture, révèle une absence de clivage protéolytique et de sécrétion pour le cDNA avec la plus grande délétion. La zone absente de cDNA entre les acides aminés 79 et 179 de l'EDA correspondrait donc au site de clivage protéolytique [Elomaa et coll., 2001]. Deux séquences distinctes de reconnaissance par la protéase Furine sont localisées entre les résidus 153-156 et 156-159 [Schneider et coll., 2001]. Des mutations par substitution nucléotidique, voire des délétions exoniques de l'ensemble de l'exon 3, sont impliquées dans des phénotypes de DEX et montrent l'importance fonctionnelle des sites de reconnaissance Furine et de la libération protéolytique de l'EDA [Bayès et coll., 1998]. L'exon 3 est un point chaud de mutation et correspond à un tiers de l'ensemble des

mutations identifiées par l'étude de Vincent et coll. (2001). Ces mutations de l'exon 3 de gène *EDA* sont localisées plus particulièrement du résidu 153-156. Les nucléotides du locus *EDA* codant pour le résidu 156, appartenant aux 2 séquences de reconnaissance Furine, sont donc particulièrement importants sur le plan fonctionnel et correspondent à une répétition de dinucléotides CpG et par conséquent à point chaud de mutation [Vincent et coll., 2001].



**Fig 5 :** Distribution des mutations pathogènes impliquées dans la DEX sur le locus *EDA* [selon Hashiguchi et coll., 2003].



**Fig 6** : (A) Structure moléculaire de l'EDA avec le site d'homologie TNF extracellulaire, le site collagen-like, le site de clivage protéolytique et le domaine intra-cytoplasmique-transmembranaire [selon Mikkola et coll., 2003].

(B) Structure quaternaire tridimensionnelle d'un homotrimère d'EDA et de la région du site TNF interagissant avec EDAR et muté dans les phénotypes d'hypodontie incisives dominante liée à l'X [selon Tarpey et coll., 2007].

## 2.2 DISTRIBUTION TISSULAIRE DE L'EDA (TA)

### 2.2.1 Distribution au niveau des structures ectodermiques et extra-ectodermiques

Le facteur Ta est exprimée dès le 15<sup>ème</sup> jour au niveau des placodes épidermiques puis dès le 16<sup>ème</sup> jour de vie embryonnaire au niveau des glandes sudoripares, des follicules pileux et des kératinocytes [Plottova et coll., 2002]. Ainsi l'EDA semble avoir un rôle fonctionnel important dans la morphogenèse précoce des placodes épidermiques [Yan et coll., 2000]. L'expression des transcrits Ta est détectée de façon continue entre 14 et 18 jours de développement embryonnaire au niveau épidermique chez la souris, le derme étant négatif pour l'expression de l'ARNm Ta [Laurikkala et coll., 2001].

Les follicules pileux immatures à ED15 n'expriment par l'ARNm Ta et présentent un marquage devenant positif parallèlement à leur maturation [Mikkola et coll., 1999]. l'ARNm Ta est présent au niveau de l'épiderme inter-folliculaire et des follicules pileux en voie de différenciation à 18 jours de développement embryonnaire [Laurikkala et coll., 2001]. L'ARNm Ta est également exprimé au niveau de la mandibule, dans les zones d'initiation des bourgeons dentaires, dès le 12<sup>ème</sup> jour de développement embryonnaire chez la souris [Ferguson et coll., 1997]. Ces données expérimentales permettent donc d'identifier le produit du gène Ta comme un facteur morphogène important dans le développement embryonnaire des dérivés ectodermiques murins et notamment dans le développement cutané-phanérien. Ces données expérimentales permettent de mieux comprendre le phénotype de sécheresse cutanée, de lésions exzématoïdes, d'hypofonctionnement sudoral et d'hypotrichose associé à la DEX.

De manière intéressante, l'hybridation *in situ* révèle la présence d'ARNm Ta au niveau de l'endoderme et de la région antérieure de la glande pituitaire à 12 jours de développement embryonnaire [Mikkola et coll., 1999]. En effet, les poches de Rathke, invagination de l'ectoderme stomodéal, se différenciant en adéno-hypophyse, expriment l'ARNm Ta dès ED10, puis les transcrits Ta sont retrouvés au niveau de l'adéno-hypophyse à ED12 [Mikkola et coll., 1999], sans expression de l'ARNm TA au niveau de la post-hypophyse, la région postérieure de la glande pituitaire, dérivant du cerveau postérieur [Mikkola et coll., 1999]. D'autres zones du système nerveux central contiennent l'ARNm Ta comme le neuroépithélium et les ventricules latéraux. Ainsi, les fonctions morphogènes de Ta ne semblent pas limitées aux structures ectodermiques, mais s'étendent au niveau central et endodermique.

L'expression des transcrits Ta au niveau de l'adéno-hypophyse en développement chez la souris suggère l'existence de fonctions moléculaires de l'EDA dans le développement de l'adéno-hypophyse, qui est une importante structure neuro-endocrinienne, sécrétant notamment la somatostatine ou hormone de croissance (GH). Une altération structurale ou fonctionnelle de l'adénohypophyse menant à un phénotype endocrinien, avec retard de croissance pourrait donc être associée au spectre syndromique de la DEX. En effet, différentes observations cliniques suggèrent l'existence d'altérations de la croissance chez des enfants atteints de DEX [Motil et coll., 2005]. Des anomalies de la croissance pondérale ont été détectées dans un groupe d'enfants DEX et des altérations de la croissance staturo-pondérale ont, quant à elles, été observées chez des enfants atteints de DEH syndromique [Motil et coll., 2005].

L'ARNm EDA est également détecté par hybridation *in situ* au niveau de l'épithélium oral fœtal humain dès la 8<sup>ème</sup> semaine, alors que l'ARNm EDAR est retrouvé au niveau de l'épithélium oral et des bourgeons dentaires au même stade de développement embryonnaire [Montonen et coll., 1998 ; Elomaa et coll., 2001]. Les bourgeons dentaires en formation sont négatifs pour l'EDA à ED 10 semaines [Montonen et coll., 1998].

L'ARNm EDAR est détecté au niveau des zones d'épaississement épithélial de l'épiderme en formation, correspondant aux futurs follicules pileux [Elomaa et coll., 2001]. Les transcrits d'EDA sont détectés à ED 16 semaines au niveau des couches basales, intermédiaires et péridermiques de l'épiderme humain, les cellules de condensation dermique à l'origine des follicules pileux étant négatives à ce stade de développement, les follicules pileux du cuir chevelu exprimant l'ARNm EDA à ED 18 semaines [Montonen et coll., 1998].

De même que pour le facteur Ta, la distribution tissulaire de l'ARNm EDA ne se limite pas aux dérivés ectodermiques, et les transcrits EDA sont localisés dès 8 semaines de développement *in utero* au niveau du neuroectoderme entourant les vésicules *cérébrales* et du canal spinal ainsi qu'au niveau cérébral [Montonen et coll., 1998]. L'ARNm EDA a été également retrouvé au niveau des ganglions spinaux dorsaux, des cornes antérieures de la moelle épinière et de l'hypothalamus [Montonen et coll., 1998]. L'expression au niveau du système nerveux central et périphérique de l'EDA suggère son implication au niveau du développement cérébral et donc l'existence d'un éventuel phénotype neurologique associé à la DEX.

L'ARNm EDA est également exprimé au niveau myocardique, cérébral, pulmonaire et rénal [Kere et coll., 1996]. L'ARNm EDA a également été identifié au niveau des ostéoblastes, du

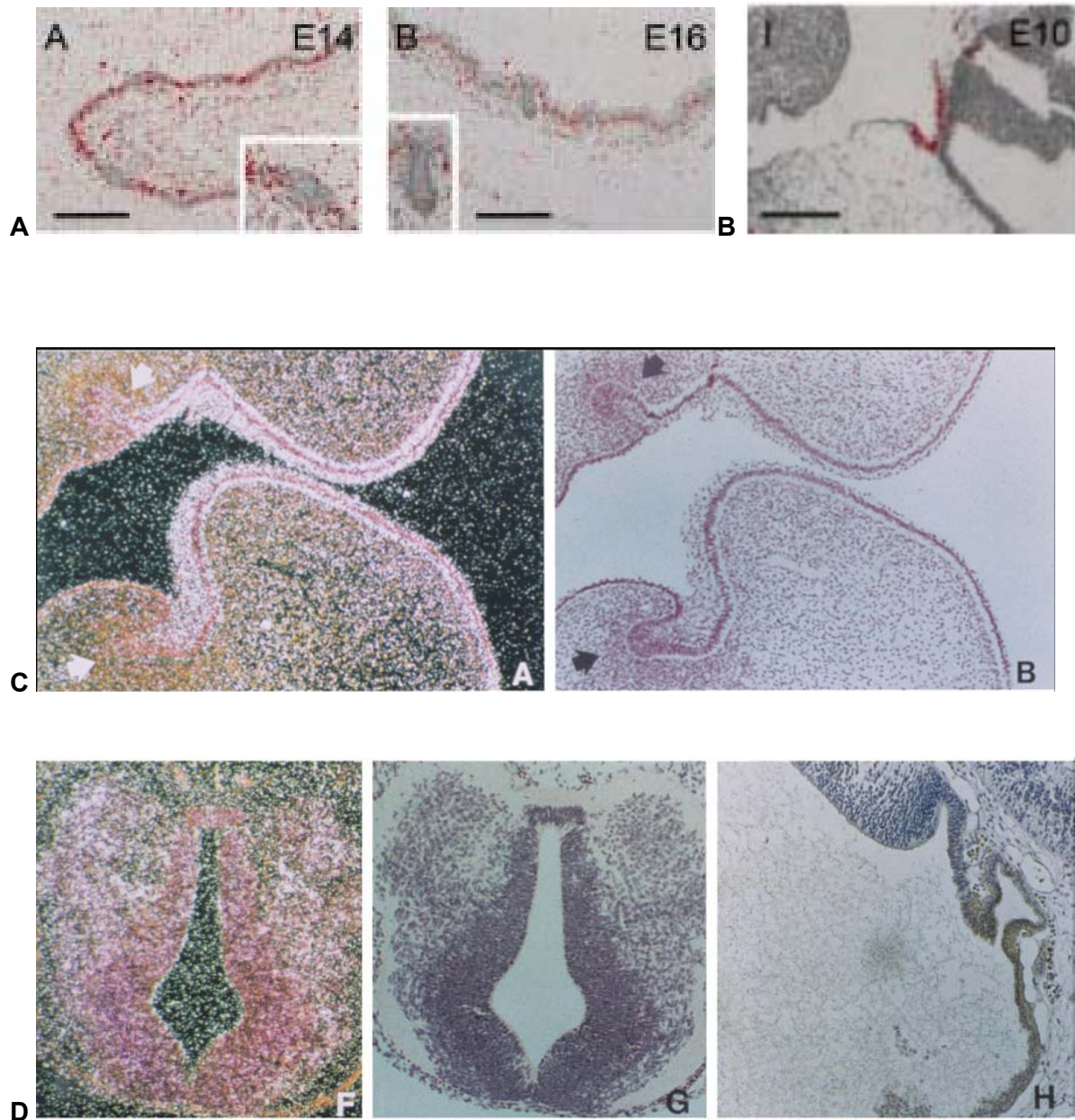


thymus, des tubules rénaux et des ganglions spinaux [Montonen et coll., 1998]. De plus l'EDAR est également transcrite dans la matrice pileuse au sein des follicules pileux à ED 20 semaines. Cette donnée expérimentale permet de comprendre qu'un dysfonctionnement de la voie de l'EDA-EDAR entraîne un phénotype de trichodysplasie. L'hybridation *in situ* révèle également un marquage positif au niveau des glandes sébacées [Elomaa et coll., 2001].

L'EDA est également exprimé au niveau de cellules épithéliales en phase de développement et des cellules épithéliales adultes [Elomaa et coll., 2001]. D'autres techniques de Northern-Blot ont étudié l'expression de l'ARNm EDA sur des prélèvements tissulaires humains adultes. Elles ont identifié une présence ubiquitaire de l'ARNm EDA au niveau pancréatique, rénal et cardiaque. Une expression plus faible a été détectée au niveau cérébral, pulmonaire, hépatique et musculaire [Kere et coll., 1996]. Des analyses par hybridation *in situ* ont également identifié une expression chez l'adulte de l'ARNm EDA au niveau de l'épithélium prostatique, de la glande mammaire et de l'hypothalamus. La fonction de l'EDA dans ces tissus épithéliaux nécessite des études ultérieures. Concernant les implications pathogéniques, une baisse de l'expression de l'EDA a été démontrée dans des lésions tumorales cutanées bénignes et malignes [Montonen et coll., 1998], tout comme dans les carcinomes prostatiques et mammaires.

Le dysfonctionnement d'une voie aussi ubiquitaire peut donc mener à des phénotypes complexes impliquant d'autres structures que les dérivés ectodermiques, comme le système nerveux central ou le massif crânio-facial [Dumic et coll., 2000]. En effet des atteintes cérébrales, comme des hétérotopies périventriculaires sub-épendymaires ont été décrites en association avec une dysplasie ectodermique pure ou syndromique [Dumic et coll., 2000].

Concernant le gène murin *Ta*, l'hybridation *in situ* a permis de localiser la présence de l'ARNm *Ta* au niveau de l'ectoderme et des follicules pileux, mais également au niveau de l'endoderme viscéral et du neurectoderme [Mikkola et coll., 1999].



**Fig 7 :** (A) Marquage épidermique des transcrits Ta chez la souris à ED 14 et ED16 avec des follicules pileux immatures négatifs [selon Mikkola et coll., 1999]  
 (B) Expression de Ta ARNm au niveau des poches de Rathke  
 (C) Localisation de l'ARNm EDA dès 8 semaines de développement embryonnaire au niveau de l'épithélium stomodéal (flèches) [selon Montonen et coll., 1998]  
 (D) Expression d'ARNm EDA au niveau du neuroectoderme entourant les vésicules cérébrales [selon Montonen et coll., 1998].

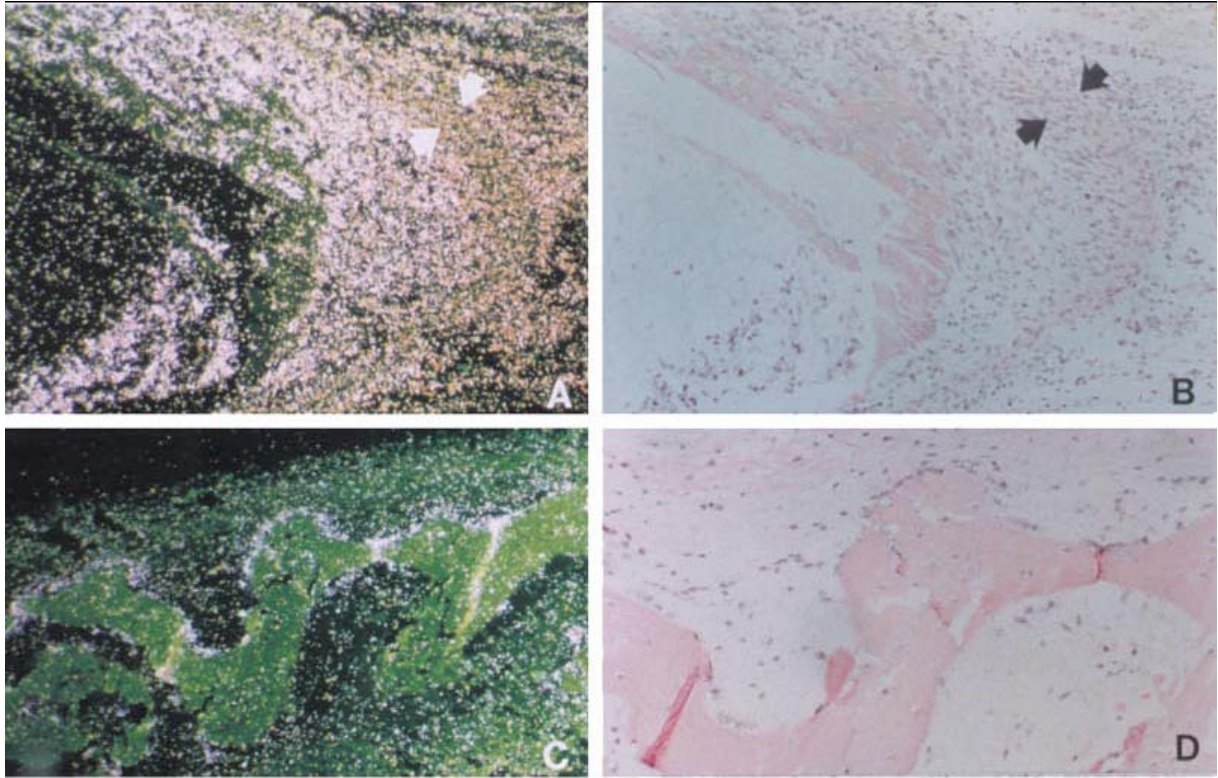
### 2.2.2 Expression tissulaire de l'EDA au niveau osseux

L'ARNm EDA a été détecté durant le développement embryonnaire humain au niveau des ostéoblastes costaux en phase de sécrétion matricielle dès 12 semaines de développement *in utero* [Montonen et coll., 1998]. Les chondrocytes et chondrocytes hypertrophiques ne présentent pas de marquage positif, ce qui montre que les processus d'ossification endochondrale ne semblent pas impliquer les fonctions moléculaires de l'EDA, contrairement à l'ossification membranaire.

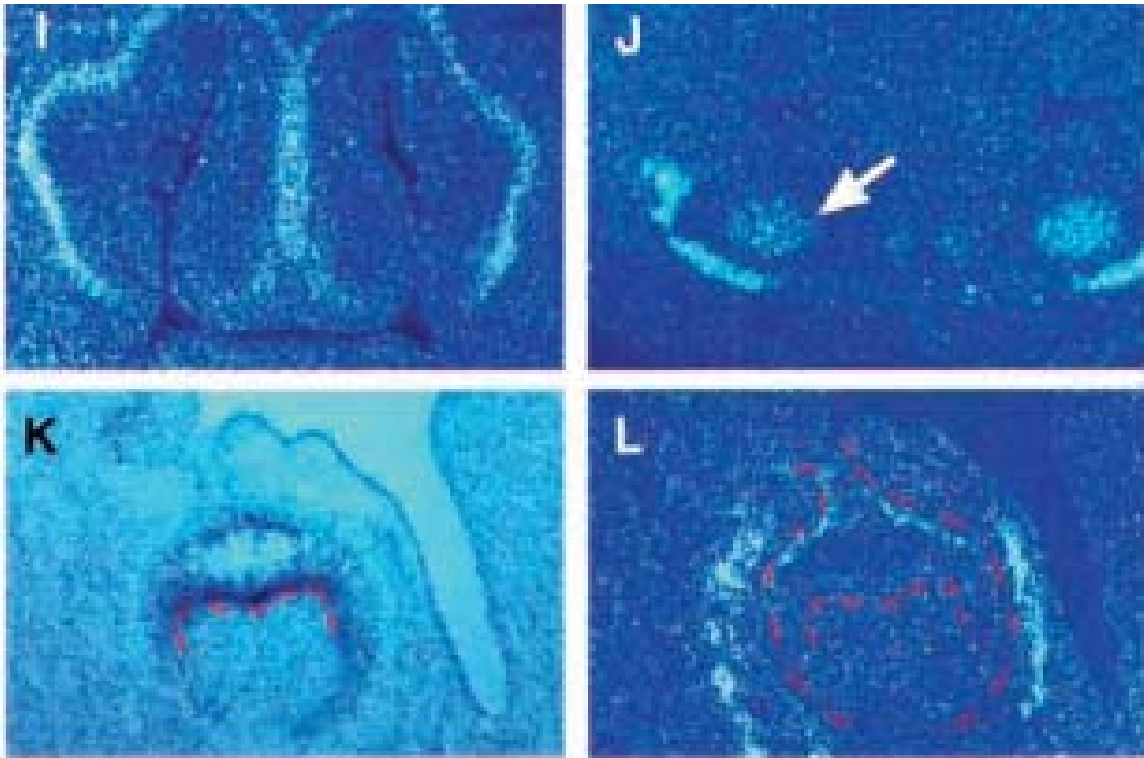
En effet, dès la 16<sup>ème</sup> semaines de développement *in-utero*, les ostéoblastes ayant déposé la matrice osseuse au niveau de la voûte crânienne sont caractérisés par un fort marquage à l'ARNm EDA, ce qui révèle l'implication de ses fonctions morphogènes dans le développement osseux crânio-facial.

L'expression ostéoblastique de DI (EDAR) a été confirmée chez le modèle murin, caractérisé par l'expression des transcrits DI (EDAR) au niveau de la mandibule en développement et du cartilage de Meckel [Tucker et coll., 2000]. Ces observations expérimentales suggèrent un rôle du récepteur EDAR et de la voie EDA-EDAR dans le développement squelettique mandibulaire [Tucker et coll., 2000].

L'expression d'EDA durant la sécrétion matricielle ostéoblastique et le développement crânio-facial suggère l'association de dysmorphies squelettiques et d'anomalies osseuses métaboliques et structurales associées au spectre phénotypique de la DEX. Ces données expérimentales confirment les observations réalisées dans le cadre du développement embryonnaire humain [Montonen et coll., 1998], avec une expression ostéoblastique de EDA et une implication de la voie EDA-NF- $\kappa$ B dans l'ostéogenèse. En effet, les transcrits Ta sont également impliqués dans le développement osseux crânio-faciale, suggérant l'existence d'un phénotype osseux associé à la mutation *EDA-Ta*.



**Fig 8** : Expression ostéoblastique de l'EDA à 12 semaines *in utero* au niveau des ostéoblastes costaux (A et B) et à 16 semaines *in utero* au niveau des ostéoblastes de la voûte crânienne (C et D) [selon Montonen et coll., 1998].



**Fig 9** : Analyse par hybridation *in-situ* de l'expression des transcrits de DI (EDAR) au niveau du cartilage de Meckel (J), de la mandibule en cours d'ossification (J) et de l'épithélium dentaire interne et externe (K).

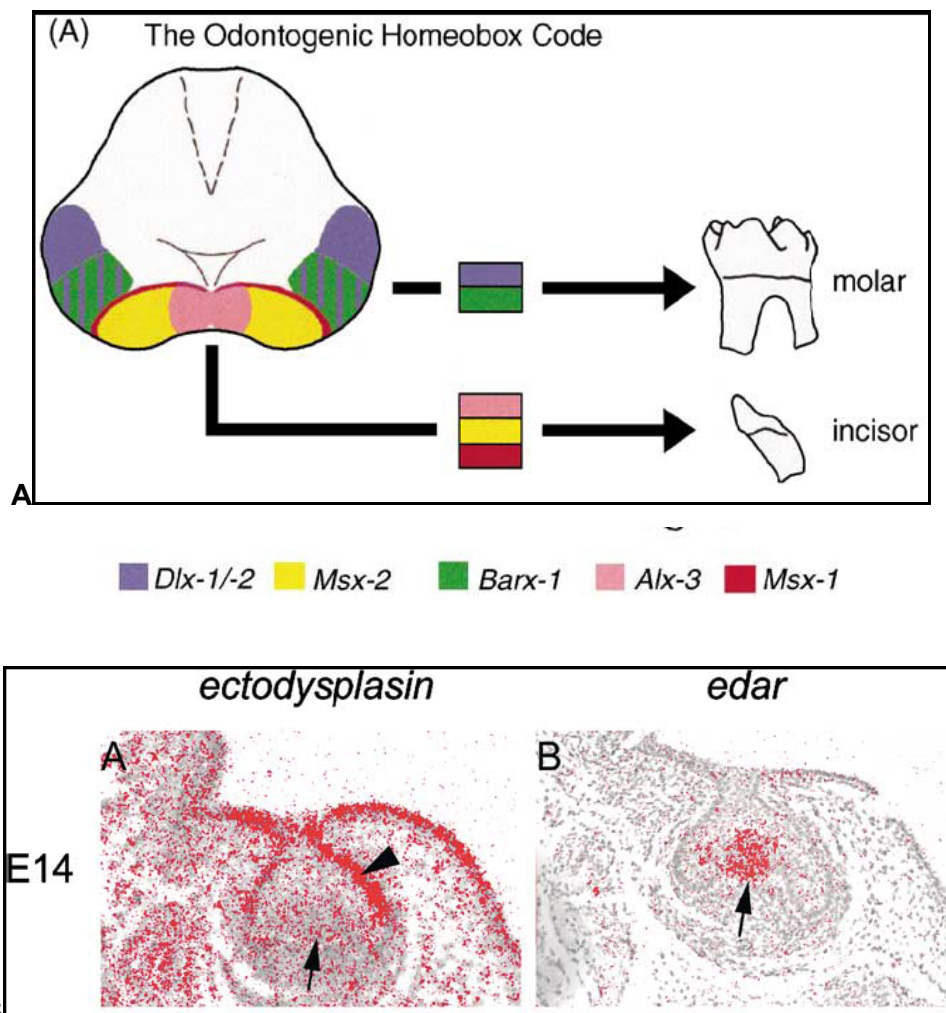
### 2.2.3 Profil d'expression de l'EDA durant l'odontogenèse

Le développement dentaire est initié à partir de l'ectoderme oral et du mésenchyme dérivé des crêtes neurales céphaliques sous-jacentes [Thesleff, 2000; Miletich et coll., 2003 ; Mikkola et Thesleff, 2003]. Le développement dentaire murin est un modèle d'étude des mécanismes moléculaires et génétiques impliqués dans l'odontogenèse [Miletich et coll., 2003]. Les interactions inductibles à médiation matricielle font intervenir l'épithélium et les cellules mésenchymateuses issues des crêtes neurales migrant vers les arcs branchiaux (Courney et coll., 2005). Le premier arc branchial d'où dérivent les organes dentaires, ainsi que les os maxillaires et mandibulaires est Hox-négatif, mais exprime d'autres gènes homéotiques (Msx, Dlx, Gsc, Barx) et facteurs de croissance [James et coll., 2002]. Un code odontogène de gènes homéotiques, dont Msx1, Dlx 5/6 et Alx3, et exprimés au niveau de l'ectomésenchyme intervient dans la différenciation des patrons dentaires [Courney et coll., 2005] (Fig 10A). Des expériences d'hybridation *in situ* durant les différentes phases de l'odontogenèse montrent la présence de l'ARNm EDAR (Downless : DI) au stade de cloche dentaire au niveau de l'épithélium dentaire et orcoll. De plus, les transcrits EDAR (DI) sont détectés au niveau de l'épithélium oral dès ED10 avant la phase de formation des placodes ectodermiques [Tucker et coll., 2000]. EDAR est le marqueur moléculaire le plus précoce de la placode dentaire en formation suivi par l'expression d'autres marqueurs de placodes comme Bmp2, Bmp4, Wnt10b Msx2 et p21 [Pispa et coll., 1999]. Cette expression précoce du récepteur EDAR suggère l'existence de fonctions moléculaires du complexe EDA-EDAR durant l'initiation de l'odontogenèse. L'ARNm EDA est également détecté au niveau de l'épithélium oral en formation durant la phase d'initiation de la morphogenèse [Elomaa et coll., 2001]. Les transcrits EDA (Ta) sont donc détectés plus tardivement à ED12 ou ED14 en fonction des études [Pispa et coll., 1999 ; Tucker et coll., 2000]. L'expression du facteur Ta, étudiée par hybridation *in situ* d'une sonde correspondant à l'exon 1 du gène Ta est identifiée au stade de bourgeon dentaire au niveau de l'épithélium dentaire, en plus de l'épithélium oral [Srivastava et coll., 1997] et dès ED 15 au niveau de l'épithélium dentaire externe et de la lame dentaire. A ED12, l'ARNm EDAR est exprimé au niveau de l'épaississement épithélial en cours d'invagination dans le mésenchyme sous-jacent, confirmant l'implication de la voie de signalisation EDA-EDAR dans l'initiation du bourgeon dentaire.

Les stades de capuchon et de cloche dentaire sont caractérisés par une expression d'EDA au niveau de l'épithélium dentaire externe, sans présence d'EDA au niveau de l'épithélium dentaire interne, de la papille dentaire ou du réticulum stellaire [Laurikkala et coll., 2001]. Ces résultats suggèrent un rôle morphogène de l'EDA durant l'odontogenèse. Le récepteur



EDAR, tout comme son Death-domaine EDARADD, est exprimé au niveau de l'Enamel Knot primaire (EK1) à ED 13.5 et 15.5 jours [Tucker et coll., 2000 ; Headon et coll., 2001]. Une distribution tissulaire complémentaire des transcrits EDA et EDAR caractérise donc le stade de capuchon dentaire à ED14, avec une localisation de EDA au niveau de l'épithélium dentaire externe et de EDAR exprimé fortement au niveau de l'Enamel Knot primaire des incisives et molaires en cours de développement [Tucker et coll., 2000]. Le stade de cloche dentaire confirme cette distribution complémentaire des ARNm EDA et EDAR, avec une localisation de EDA au niveau de l'épithélium dentaire externe et de EDAR au niveau de l'épithélium dentaire interne [Tucker et coll., 2000]. Les transcrits EDAR sont également exprimés chez la souris au niveau des glandes exocrines de la face, comme les glandes salivaires et les glandes séreuses nasales, confirmant les fonctions moléculaires de EDA (Ta) dans la morphogenèse de l'ensemble des dérivés ectodermiques.



**Fig 10** : (A) Le code odontogène de gènes homéotiques [selon Courtney et coll., 2005].  
 (B) Immunolocalisations complémentaires de l'EDA au niveau épithélial et son Récepteur EDAR au niveau de l'Enamel Knot durant le développement dentaire chez la souris au stade ED 14 de capuchon dentaire [selon Mikkola et coll., 2003].

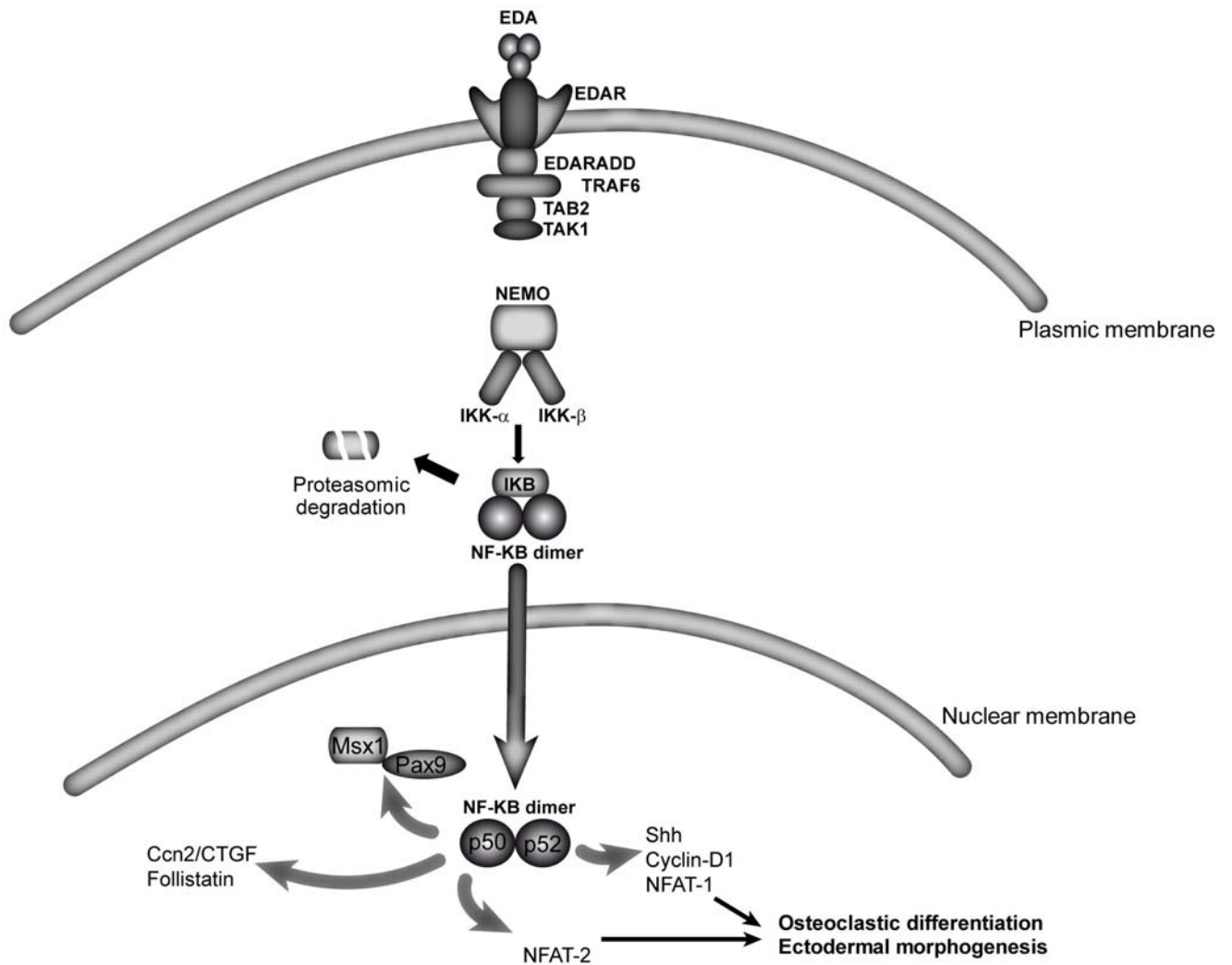
## **2.3 LA VOIE EDA-TRAF-IKK-NF- $\kappa$ B DANS LE DEVELOPPEMENT ECTODERMIQUE ET OSSEUX**

### **2.3.1 Le complexe moléculaire EDA-EDAR-TAB2-TAK1-TRAF6**

L'EDA est une molécule de la superfamille des TNF de localisation membranaire et libérée dans le milieu extracellulaire après clivage protéolytique, permettant la liaison à son récepteur EDAR [Ferguson et coll., 1997]. La liaison au Récepteur EDAR, caractérisée par la présence d'un Death-Domain intracellulaire EDARADD (Ectodysplasin Receptor Associated Death Domain), mène à l'activation du complexe NEMO/IKK et du facteur NF-kappaB via les molécules adaptatrices TAB2 (TAK1 Binding protein-2), TAK1 (TGF- $\beta$  Activated Kinase-1) et TRAF6 dont nous allons décrire les caractéristiques fonctionnelles [Galibert et coll., 1998 ; Takaesu et coll., 2000 ; Aradhya et coll., 2001 ; Headon et coll., 2001 ; Thesleff et coll., 2002 ; Morlon et coll., 2005]. TRAF6 et NF- $\kappa$ B sont également des facteurs essentiels dans les mécanismes d'ostéoclastogenèse et d'activation ostéoclastique induits par la voie de signalisation RANKL (Receptor Activator NF- $\kappa$ B Ligand)-RANK (Receptor Activator NF- $\kappa$ B) [Armstrong et coll., 2002 ; Mizukami et coll., 2002 ; Chaisson et coll., 2004 ; Asagiri et coll., 2007]. Pour assurer son rôle physiologique dans les mécanismes de remodelage osseux et de résorption ostéoclastique, RANKL active également la voie NF- $\kappa$ B via les mêmes molécules adaptatrices TAB2 et TRAF6 [Mizukami et coll., 2002].

L'activation du facteur NF- $\kappa$ B nécessite le recrutement de molécules cytoplasmiques d'adaptation TAB2, TAK1 et TRAF6 jouant un rôle majeur dans la voie de signalisation EDA-NF- $\kappa$ B [Morlon et coll., 2005], qui est IKK-dépendant [Doffinger et coll., 2001]. EDARADD active IKK via TAB2 dont l'interaction avec EDARADD a été démontrée par sur-expression de EDARADD recombinante et identification de l'interaction EDARADD-TAB2 [Makris et coll., 2002 ; Morlon et coll., 2005]. TAB2 endogène intervient donc dans la liaison entre EDARADD-TRAF6 et TAK1 (Fig 11). Des expériences de co-immunoprécipitation confirment l'interaction EDARADD-TAB2. TRAF6 co-immunoprécipite également avec le domaine EDARADD, de par l'existence de sites de liaisons TRAF au niveau de EDARADD, formant ainsi un complexe TAB2-TRAF6-EDARADD activant TAK1 et les kinases IKK [Morlon et coll., 2005]. Des expériences de co-immunoprécipitation ont montré les interactions EDARADD-TRAF6 et EDARADD-TAK1, les 2 complexes moléculaires étant formés par immuno-précipitation lors de la sur-expression par transfection de EDARADD-TRAF6 ou EDARADD-TAK1 [Morlon et coll., 2005]. De façon intéressante, le complexe endogène TAB2-TRAF6-TAK1 co-immunoprécipite avec EDARADD sur-exprimé dans un modèle de

culture cellulaire transfecté et l'inhibition de TAB2 et TAK1 entraîne une absence d'activation de NF- $\kappa$ B [Morlon et coll., 2005]. Ces résultats expérimentaux montrent l'importance des facteurs TAB2 et TAK1 dans la voie de signalisation NF- $\kappa$ B (Fig 11).



**Fig 11** : Voie de transduction EDA-NF- $\kappa$ B via EDAR et les molécules adaptatrices TAB2, TAK1 et TRAF6 menant à l'activation du complexe NEMO/IKK, la translocation nucléaire de NF- $\kappa$ B dimérique et l'activation des cibles transcriptionnelles de l'EDA (adapté de Clauss et coll.).



### 2.3.2 Fonctions biologiques de TRAF6

TRAF6 est également un élément majeur dans la voie de transduction de l'EDA, aussi bien au niveau du développement ectodermique que squelettique, ce qui est démontré par le phénotype associé au modèle murin Knock-out TRAF6 *-/-* [Sinha et coll., 2002 ; Naito et coll., 2002]. En effet, un phénotype d'hypotrichose est observé avec une alopecie rétro-auriculaire et caudale, ainsi qu'une dilution pigmentaire correspondant fortement au phénotype observé au niveau du modèle murin Tabby [Naito et coll., 2002].

Des analyses histologiques ont montré l'absence de follicules pileux à ED 15,5 chez les embryons homozygotes TRAF6 *-/-*, contrairement aux embryons hétérozygotes pour l'inactivation TRAF6 présentant des follicules pileux [Naito et coll., 2002]. Les souris homozygotes TRAF6 *-/-* sont également caractérisées par l'absence de glandes sudoripares au niveau palmaire et l'altération du développement des glandes sébacées [Naito et coll., 2002]. Ce phénotype similaire au modèle Tabby montre l'implication de TRAF6 dans la morphogenèse ectodermique et son importance dans la voie EDA-NF- $\kappa$ B. En effet, des expériences d'immuno-histochimie ont permis de localiser le facteur TRAF6 au niveau des follicules pileux en cours de développement dès ED15,5 chez la souris. De plus le facteur TRAF6 est également immunolocalisé au niveau des glandes sébacées et sudoripares en période néo-natale dès 5 jours [Naito et coll., 2002]. Ces résultats confirment les fonctions moléculaires importantes de TRAF6 dans la voie de transduction de l'EDA.

Les molécules adaptatrices TAB2, TAK1 et TRAF6 sont autant de nouveaux gènes candidats dans le cadre de dysplasies ectodermiques hypohidrotiques non-*ED1* et non-*EDAR* dont les gènes peuvent être séquencés en seconde intention après *ED1* et *EDAR*.

A côté des implications des molécules de la famille TRAF, et notamment TRAF6, dans le développement des glandes exocrines et des phanères, leur rôle dans l'odontogenèse est également démontré par immunolocalisation et analyse du phénotype dentaire du modèle murin TRAF6 *-/-* [Ohazama et coll., 2004]. TRAF6 est exprimé chez la souris au niveau de la placode dentaire dès le stade d'initiation de l'odontogenèse, puis est immunolocalisé au niveau de l'épithélium dentaire et du mésenchyme péri-dentaire au stade de bourgeon [Ohazama et coll., 2004]. L'expression de TRAF6 est retrouvée au stade de capuchon dentaire au niveau de l'épithélium dentaire externe et interne tout comme au stade de cloche [Ohazama et coll., 2004].

TRAF6 est caractérisée par une distribution tissulaire similaire au complexe EDA-EDAR durant l'odontogenèse, EDAR étant localisé au niveau de la placode dentaire et EDA au niveau de l'épithélium. Le phénotype dentaire de TRAF6 est caractérisé par une Enamel-Knot hypotrophique avec une réduction du territoire d'expression des marqueurs moléculaires de l'Enamel-Knot Shh, Wnt10b et p21 suggérant un rôle de TRAF6 dans la cuspidogenèse en association avec EDA-EDAR [Ohazama et coll., 2004]. Des anomalies morphologiques au niveau des molaires du modèle TRAF6 *-/-* sont également observées avec des cuspides de développement réduit et arrondies [Ohazama et coll., 2004]. Le phénotype dentaire similaire du modèle murin par rapport aux modèles Tabby et Crinkled confirme la liaison étroite entre EDA-EDAR et TRAF6 durant la morphogenèse ectodermique.

Les facteurs d'adaptation TRAF3 et TRAF6 sont également essentiels dans l'activation de NF- $\kappa$ B par l'isoforme EDA-A2, via le récepteur XEDAR (X-linked Ectodysplasin Receptor) [Sinha et coll., 2002]. En effet, EDA-A2 induit l'activation de NF- $\kappa$ B par phosphorylation de I $\kappa$ B dans des cellules transfectées et exprimant de façon stable XEDAR [Sinha et coll., 2002]. Ce processus est fonction du recrutement des molécules d'adaptation TRAF3 et TRAF6, ce qui a été montré par immunoprécipitation de XEDAR et TRAF3/6 après traitement par l'EDA-A2 [Sinha et coll., 2002]. De plus, la transfection de mutants dominant-négatifs de TRAF3/6 entraîne une inhibition de l'activation de NF- $\kappa$ B EDA-A2-XEDAR dépendante [Sinha et coll., 2002]. En plus du facteur NF- $\kappa$ B, XEDAR active également la voie de signalisation des kinases JNK1 et JNK2, qui constituent donc d'autres molécules situées en aval de la voie de l'EDA [Sinha et coll., 2002].

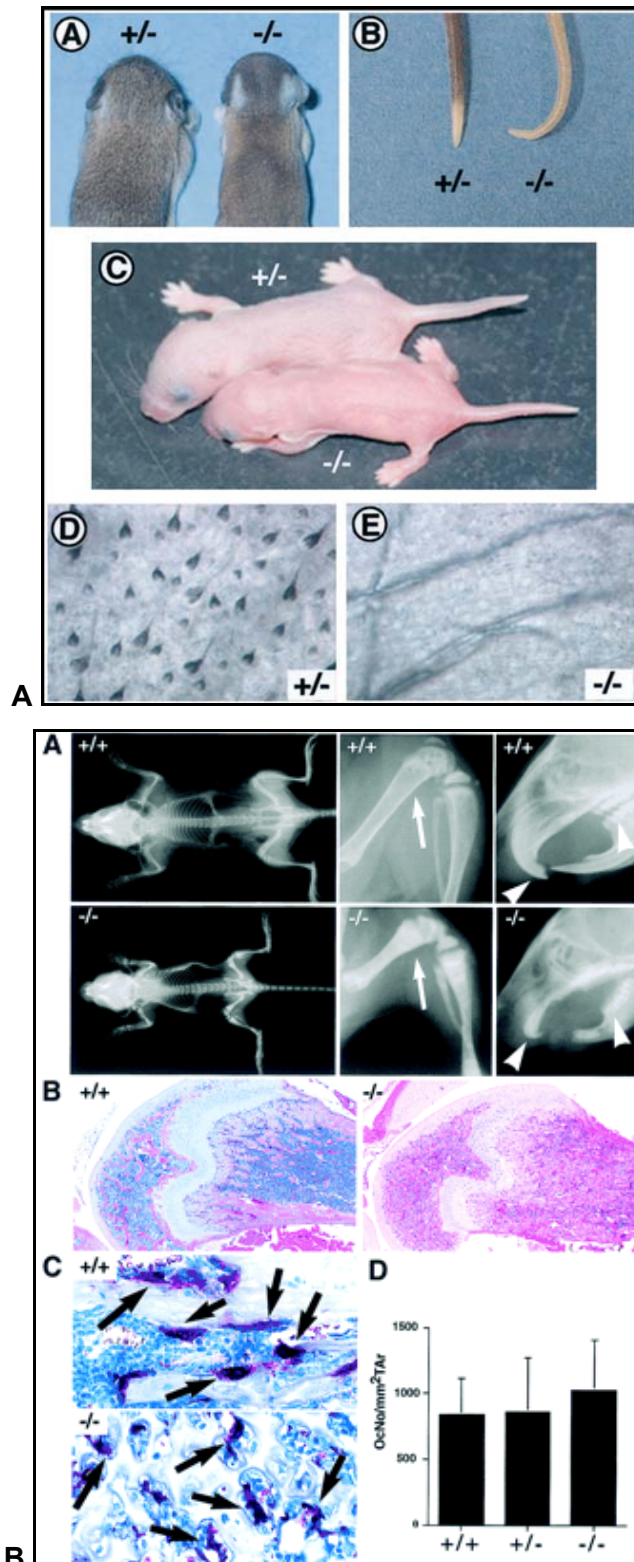
### **2.3.3 Interactions entre les voies de l'EDA et RANKL via TRAF6 et NF- $\kappa$ B**

TRAF6 est également fortement impliqué dans le métabolisme et le modelage osseux, notamment *via* la voie de RANK-RANKL, ce qui est démontré par le phénotype squelettique du modèle murin de Knock-out TRAF6 $-/-$  [Lomaga et coll., 1999 ; Mizukami et coll., 2002 ; Lamothe et coll., 2007]. En effet, les souris TRAF6  $-/-$  sont ostéopétrotiques et caractérisées par une forte radio-opacité des fémurs, des tibias et du squelette crânio-facial. Un élargissement métaphysaire est également observé au niveau des os longs, caractéristique d'un défaut de remodelage osseux [Lomaga et coll., 1999]. La tomographie quantitative périphérique a permis de confirmer cette augmentation généralisée de la densité minérale osseuse. Un défaut d'éruption des molaires et incisives des souris TRAF6  $-/-$  est observé et

caractéristique de l'ostéopétrose, tout comme l'oblitération médullaire des os longs par des trabécules osseuses et du cartilage hypertrophique [Lomaga et coll., 1999].

Les analyses histologiques osseuses montrent, malgré l'ostéopétrose, la présence d'ostéoclastes TRAP+ (Tartrate Resistant Alkaline Phosphatase : marqueur moléculaire ostéoclastique) chez les souris hétérozygotes et homozygotes TRAF6<sup>-/-</sup>, suggérant une altération de l'activation ostéoclastique, et non de l'ostéoclastogénèse. En effet, les ostéoclastes TRAP+ ne sont pas en contact avec la surface osseuse et ne présentent pas d'activité de résorption osseuse [Lomaga et coll., 1999]. Aucune image de lacune de résorption ostéoclastique n'est observée chez les souris TRAF6<sup>-/-</sup> [Lomaga et coll., 1999]. Les ostéoclastes en contact avec la surface osseuse présentent une zone d'adhésion partielle et une désorganisation de la bordure en brosse ostéoclastique confirmant le rôle essentiel de TRAF6 dans la voie de signalisation RANKL et l'activation ostéoclastique. Le phénotype ostéopérotique des souris TRAF6<sup>-/-</sup> est donc similaire à celui du modèle murin déficient en *c-src* tyrosine kinase, dont l'ostéopétrose est liée à un défaut de fonction ostéoclastique, plutôt que de la différenciation ostéoclastique à partir des précurseurs de la lignée myélomonocytaire [Soriano et coll., 1991].

**TRAF6 est donc également une molécule essentielle dans l'activation ostéoclastique et semble impliquée dans les voies de signalisation EDA-NF- $\kappa$ B et RANKL-RANK. Des interactions fonctionnelles entre ces deux voies, via TRAF6, interviennent et peuvent être perturbées par la mutation *ED1***



**Fig 12** : (A) Phénotype cutané-phanérien du modèle murin TRAF6  $-/-$  avec alopecie régionale, translucidité cutanée néo-natale et présence de follicules pileux non pigmenté [selon Naito et coll., 2002].

(B) Phénotype ostéopérotique du modèle murin TRAF6  $-/-$  avec radio-opacité, oblitération médullaire et absence d'activation ostéoclastique [selon Lomaga et coll., 1999].

#### **2.3.4 Interactions moléculaires entre EDA-NF-κB et les voies de signalisation Wnt, Activine-β, FGF, BMP et EGF**

La voie de signalisation EDA-NF-κB n'est pas isolée et est en interaction avec de nombreuses autres molécules de signalisation durant le développement embryonnaire [Laurikkala et coll., 2001 ; Pummila et coll., 2007] (Fig. 12). Ces interactions intervenant dans le développement ectodermique normal peuvent être altérées par des modifications de structure et de fonction de l'EDA dans le cadre de la DEX.

La voie de Wnt-β-caténine-Lef1 est considérée comme une voie essentielle dans l'induction des placodes ectodermiques et Wnt apparaît comme un des premiers signaux moléculaires d'origine mésenchymateuse et également comme un marqueur précoce des placodes [Pispa et coll., 2003]. Le facteur Wnt est un activateur de placode et la production ectopique de β-caténine induit la différenciation de follicules pileux supplémentaires [Noramly et coll., 1999]. Le facteur Wnt est également situé en amont de la voie EDA-NF-κB et Lef-1 induit l'expression d'EDA, montrant l'existence d'interactions étroites entre ces deux voies [Laurikkala et coll., 2001]. En effet, Wnt-6 induit l'expression d'EDA dans des explants dentaires *in vitro*, cette activation transcriptionnelle étant spécifique car les autres molécules testées (Bmp-2, Fgf-2 et Fgf-4) n'induisent pas l'expression d'EDA [Laurikkala et coll., 2001]. De plus, aucune expression ectodermique d'EDA n'est associée au modèle murin de Knock-out Lef1 *-/-* confirmant les interactions entre EDA et Wnt-β-caténine-Lef1.

La voie de l'Activine-β est également impliquée dans la morphogenèse ectodermique et est en interaction avec EDA-NF-κB [Matzuk et coll., 1995]. L'activine-β, se fixant à un récepteur dimérique à activité kinase intrinsèque et activant les facteurs transcriptionnels Smad, est exprimée au niveau du mésenchyme sous-jacent aux placodes ectodermiques et est donc impliquée dans la différenciation ectodermique précoce [Matzuk et coll., 1995]. Le modèle murin de Knock-out Activine-β *-/-* est caractérisé par un phénotype avec absence de développement des dents et follicules pileux [Matzuk et coll., 1995]. L'activine-β induit l'expression *in vitro* sur des explants cutanés et dentaires du Récepteur EDAR via l'activation transcriptionnelle induite par le facteur Smad phosphorylé [Laurikkala et coll., 2001]. La voie de l'activine-β intervient donc dans une boucle de régulation positive de la voie de signalisation EDA-NF-κB.

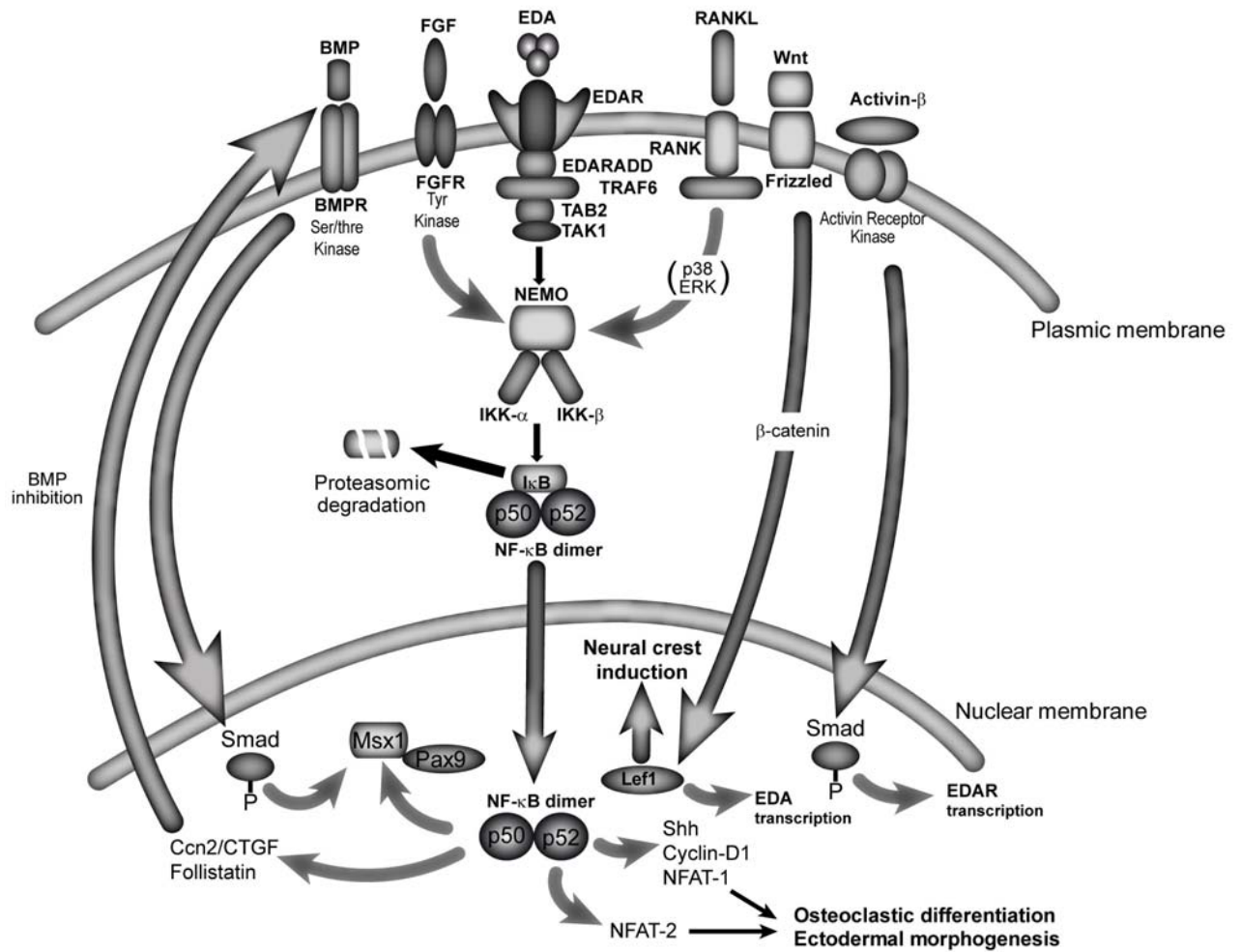
La voie de signalisation FGF est essentielle dans les processus de différenciation ectodermique précoce et la formation des placodes dentaires est régulée par une balance entre FGF et BMP [Neubüser et coll., 1997 ; Bushdid et coll., 2001]. Le modèle d'inactivation conditionnelle de Fgf8 au niveau du premier arc branchial présente un phénotype avec absence de développement dentaire

[Trumpp et coll., 1999]. Une convergence entre les voies FGF et EDA-NF- $\kappa$ B est suggérée, étant donné les altérations de l'expression de différentes isoformes FGF associées au modèle murin Tabby. La réduction de la signalisation FGF est suggérée dans les anomalies de la cuspidogenèse et du développement dentaire associées à la DEX [Pispa et coll., 1999]. En effet, le domaine d'expression de *Fgf4* est réduit au niveau de la molaire Tabby au stade capuchon. *Fgf3* et *Fgf10* sont caractérisés par une intensité d'expression réduite au niveau de la papille mésenchymateuse dentaire de la molaire Tabby en stade capuchon [Pispa et coll., 1999]. De plus, l'administration de *Fgf-10* exogène sur des explants dentaires Tabby permet une réversion partielle du phénotype avec différenciation de cuspides supplémentaires *in-vitro* [Pispa et coll., 1999]. La mutation *EDA* semble donc altérer les fonctions de FGF en raison des interactions étroites entre ces deux voies de signalisation. La voie FGF stimule également l'expression d'un gène homéotique important dans l'odontogenèse appelé *Msx1* et dont la mutation est impliquée dans les oligodonties non-syndromiques [Vastardis et coll., 1996]. La mutation *EDA* pourrait donc perturber les fonctions moléculaires de *Msx1* par l'intermédiaire de la voie FGF, ce qui serait à l'origine du phénotype dentaire de la DEX avec agénésies multiples. En effet, FGF stimule la production de *Msx1* par l'intermédiaire de NF- $\kappa$ B, montrant l'association entre les voies EDA-NF- $\kappa$ B et FGF-*Msx1* [Bushdid et coll., 2001].

La voie BMP-*Msx* est identifiée comme inhibitrice de la différenciation des placodes ectodermiques, l'expression ectopique de *Bmp-2* ou *Bmp-4* entraînant une absence de différenciation des follicules pileux [Tucker et coll., 1998 ; Bei et coll., 1998 ; Bei et coll., 2000 ; Ashique et coll., 2002]. De façon intéressante, la voie EDA-NF- $\kappa$ B inhibe la voie des BMP *via* la production de deux inhibiteurs spécifiques de BMP appelé *Ccn2/CTGF* (CCN family protein 2/Connective Tissue Growth Factor) et la follistatine [Pummila et coll., 2007]. Cette activité d'inhibition de BMP par l'EDA est essentielle aux processus de différenciation des placodes ectodermiques. En effet, l'administration exogène d'un autre inhibiteur de BMP appelé *Noggin* permet une réversion du phénotype Tabby au niveau d'explants cutanés en culture et stimule la production de follicules pileux [Pummila et coll., 2007]. Ainsi l'EDA inhibe l'activité des BMP sur des explants dentaires en culture en induisant la production de *Ccn2* et follistatine [Pummila et coll., 2007].

Une convergence entre les voies de signalisation de l'EDA et celle du facteur EGF (Epidermal Growth Factor) ont été démontrées [Blecher et coll., 1990 ; Pispa et coll., 1999]. En effet une réversion partielle du phénotype Tabby avec stimulation du développement de glandes exocrines sudoripares a été décrite après administration systémique d'EGF [Blecher et coll., 1990]. Les taux plasmatiques et urinaires d'EGF des patients DEH et de souris Tabby ne sont pas significativement différents aux taux contrôles, néanmoins les récepteurs EGFR de l'EGF sont caractérisés par une forte baisse d'expression au niveau de fibroblastes de patients DEH [Vargas et coll., 1996]. Une

altération générale de la signalisation EGF, non limitée aux dérivés ectodermiques, est associée au phénotype de la DEX, la réduction du taux d'EGFR ayant été identifiée au niveau des fibroblastes dermique et des hépatocytes de souris Tabby [Vargas et coll., 1996].



**Fig 13** : Interactions moléculaires entre la voie NF-κB et les molécules de signalisation Wnt, activine-β, BMP-Msx1 et FGF [Claus et coll., in press 2008].

## **2.4 LES VOIES DE SIGNALISATION RANKL (RECEPTOR ACTIVATOR NF- $\kappa$ B LIGAND)-EDA-NF- $\kappa$ B**

### **2.4.1 Structure et fonctions de la voie RANKL-RANK-NF- $\kappa$ B**

Le facteur TRAF6, en association avec, TAB2 et TAK1, est fortement impliqué dans la voie de signalisation de RANKL et donc l'ostéoclastogenèse et l'activation ostéoclastique [Galibert et coll., 1998 ; Mizukami et coll., 2002 ; Lee et coll., 2003 ; Gohda et coll., 2005 ; Lamothe et coll., 2007]. RANKL est une cytokine appartenant à la même famille TNF que l'EDA et essentielle dans les processus physiologiques de remodelage osseux et d'ostéoclastogenèse [Khosla, 2001]. TRAF6 est une molécule adaptatrice essentielle à la formation des ostéoclastes multi-nucléés, *via* une activité enzymatique RING-ubiquitine (Ub) ligase permettant une auto-ubiquitination de TRAF6, menant à l'activation en aval du complexe NEMO-IKK $\alpha$ -IKK $\beta$  [Lamothe et coll., 2007]. RANKL intervient également dans l'inhibition de l'apoptose ostéoclastique [Khosla, 2001].

L'homéostasie osseuse est dépendante de la balance entre les fonctions ostéoblastiques d'apposition osseuse et ostéoclastiques de résorption osseuse faisant intervenir de nombreuses molécules de signalisation dont RANKL [Blin-Wakkach et coll., 2004].

RANKL est exprimée principalement au niveau des tissus osseux, médullaires et lymphoïdes et intervient, en association avec d'autres facteurs de croissance comme le M-CSF (Macrophage-Colony Stimulating Factor), dans la différenciation des pré-ostéoclastes exprimant son récepteur RANK [Khosla, 2001]. La libération de RANKL dans le milieu extracellulaire se fait selon le même mécanisme de clivage protéolytique que l'EDA, faisant intervenir d'autres protéases que la furine que sont la TNF Converting Enzyme (TACE), une disintegrin et les métallo-protéases membranaires (MMP) MT1-MMP, MMP 19, MMP-14 et ADAM-10 [Hikita et coll., 2006]. L'interaction RANKL-RANK mène au recrutement de TRAF6-TAB2-TAK1 et à l'activation de NF- $\kappa$ B dimérique composé des sous-unités p50/p52, par l'intermédiaire des MAP Kinases ERK, p38 et JNK [Mizukami et coll., 2002 ; Lee et Kim, 2003]. La protéine tyrosine Kinase c-src, appartenant à la voie de signalisation du M-CSF, est également activée et contrôle l'adhésion ostéoclastique *via* l'intégrine  $\alpha$ 5/ $\beta$ 3, récepteur à la vitronectine [Blin-Wakkach et coll., 2004]. La voie de signalisation RANKL intervient également dans les processus d'activation ostéoclastique, en plus de l'ostéoclastogenèse, en induisant l'expression d'enzymes comme la TRAP (Phosphatase Acide Tartrate-Résistante) impliquée dans la déphosphorylation des protéines matricielles et donc la dégradation de la matrice extracellulaire organique osseuse [Hayman et coll., 1996]. En association avec le M-CSF, RANKL active également le facteur transcriptionnel MITF (Microphthalmia



Transcription Factor) impliqué dans les processus de fusion et d'activité ostéoclastique [Hodgkinson et coll., 1993].

Les modèles murins Knock-out avec inactivation des gènes codant pour le facteur MITF ou TRAP sont caractérisés par une anomalie de la différenciation ostéoclastique et un phénotype ostéopétrotique, associé, dans le cadre du Knock-out *TRAP*, à une anomalie de l'ossification enchondrale [Hodgkinson et coll., 1993 ; Hayman et coll., 1996].

**Ces différents modèles murins présentent un phénotype d'augmentation de la densité osseuse, également observé chez le modèle Tabby [Hill et coll., 2002], montrant que les mêmes mécanismes moléculaires d'altération de la voie NF- $\kappa$ B et de la différenciation ostéoclastique semblent impliqués.**

Des interactions et mécanismes moléculaires coopératifs ont été décrits entre la voie TNFR, à laquelle appartient EDAR, et RANKL [Zhang et coll., 2001]. En effet, une association synergique a été décrite sur un modèle de culture cellulaire de précurseurs ostéoclastiques entre une molécule de la famille TNF et RANKL (Zhang et coll., 2001). Ainsi, une augmentation de l'ostéoclastogenèse et de l'expression des médiateurs de RANKL (c-src, TRAF2 et TRAF6) a été observée après traitement par TNF, suggérant des interactions fonctionnelles entre les deux voies de signalisation (Zhang et coll., 2001). La voie RANKL-RANK, ainsi que l'inhibiteur endogène de RANKL, l'ostéoprotégérine (OPG) sont également impliquées dans de nombreux processus de résorption osseuse pathologique, comme les arthrites inflammatoires, les destructions articulaires, les érosions osseuses intra-articulaires ou les métastases tumorales osseuses [Lubberts, 2003; Hui et coll., 2005; Dougall et Chaisson, 2006 ; Jin et coll., 2007]. En effet, les mécanismes de résorption ostéoclastique jouent un rôle prépondérant dans les complications squelettiques de l'arthrite rhumatoïde consistant en érosions osseuses focales et diffuses, ainsi qu'en ostéoporose péri-articulaire et impliquant des interactions entre la voie RANKL/RANK/OPG et les lymphocytes T activés [Bezerra et coll., 2005]. En effet, le facteur RANKL est exprimé par les lymphocytes T induisant la différenciation ostéoclastique et la destruction osseuse corticale et trabéculaire arthritique [Bezerra et coll., 2005]. Les lésions ostéolytiques des métastases osseuses tumorales des carcinomes du sein ou de la prostate se font sur le même mode d'activation de la voie NF- $\kappa$ B via RANKL [Dougall et Chaisson, 2006].

RANKL et la voie NF- $\kappa$ B sont également impliqués dans le développement squelettique, aussi bien des os longs, caractérisés par une ossification enchondrale, que des os du massif crânio-facial [Kartsogiannis et coll., 1999]. En effet, RANKL est exprimé durant le développement embryonnaire murin au niveau des chondrocytes préhypertrophiques et hypertrophiques des os longs, mais également au niveau des cellules mésenchymateuses et des ostéoblastes en phase de sécrétion

matricielle des os crânio-faciaux [Kartsogiannis et coll., 1999]. Les ostéocytes n'expriment pas les transcrits de RANKL, suggérant que la voie RANKL-NF- $\kappa$ B est impliquée dans le métabolisme et la croissance osseuse [Kartsogiannis et coll., 1999].

RANKL et l'OPG sont impliqués dans le développement du cartilage de Meckel chez la souris [Sakakura et coll., 2005]. En effet, RANKL est immunolocalisé au niveau des cellules chondrogéniques et des chondrocytes matures du cartilage de Meckel à ED 14 et 15, alors que le périchondre est négatif. RANKL est également retrouvé au niveau du tissu mésenchymateux de la mandibule en développement et des centres d'ossification à ED15 [Sakakura et coll., 2005], confirmant son implication dans le développement mandibulaire. L'OPG est également immunolocalisée au niveau des chondrocytes du cartilage de Meckel et des ostéoblastes de la mandibule en formation, montrant l'existence d'une balance entre RANKL et OPG intervenant dans les processus de résorption du cartilage de Meckel [Sakakura et coll., 2005]. Le marqueur ostéoclastique TRAP est également retrouvé au niveau de la mandibule en développement, et plus précisément au niveau de la région latérale et médiane caractérisée par des processus de résorption du cartilage de Meckel [Sakakura et coll., 2005]. Un phénomène de superposition entre l'immunolocalisation de RANKL et de TRAP est observé au niveau du cartilage de Meckel en cours de résorption, confirmant l'importance de la voie RANKL-NF- $\kappa$ B et des processus de résorption ostéoclastique dans le développement mandibulaire embryonnaire. En effet, le cartilage de Meckel est une structure importante, support de la mandibule embryonnaire et déterminant sa future morphologie [Frommer et coll., 1971].

L'analyse des différents sites de liaison intracellulaire TRAF du récepteur RANK a montré que seule l'interaction RANK-TRAF6 est nécessaire à l'activation ostéoclastique, confirmant les fonctions moléculaires importantes de TRAF6 dans la voie de transduction RANKL-RANK [Galibert et coll., 1998 ; Armstrong et coll., 2002]. La surexpression isolée de TRAF6 et RANK dans un modèle cellulaire confirme l'interaction entre le récepteur RANK et TRAF6 et donc l'existence de sites de liaison intracellulaire TRAF aussi bien pour le RANK que pour EDARADD [Misukami et coll., 2002]. De même TAB2 et TAK1 surexprimées isolément co-immunoprécipitent avec RANK. Les mêmes expériences de surexpression par transfection de RANK et de co-immunoprécipitation ont mené à la formation d'un complexe moléculaire RANK-TRAF6-TAB2-TAK1 après stimulation par RANKL [Mizukami et coll., 2002]. De plus, la transfection cellulaire d'une version tronquée de TRAF6 inhibe l'activation de NF- $\kappa$ B induite par RANKL [Mizukami et coll., 2002]. La surexpression dans le même modèle cellulaire d'une kinase mutée TAK1 ou d'une forme tronquée de TAB2 inhibe également l'activation RANKL-dépendante de NF- $\kappa$ B [Misukami et coll., 2002]. L'activation de NF- $\kappa$ B par RANKL nécessite donc la présence de TAB2 permettant l'interaction RANK-TRAF6 avec TAK1, TAB2 jouant le rôle de molécule de pontage [Takaesu et coll., 2000].

## 2.4.2 Le facteur transcriptionnel NF- $\kappa$ B et inactivations des sous-unités monomériques Rel

Le facteur NF- $\kappa$ B est un facteur transcriptionnel pléiotropique impliqué dans les processus anti-infectieux et inflammatoires, dans l'apoptose et la croissance cellulaire [Beg et coll., 1993; Snapper et coll., 1996 ; Smahi et coll., 2002]. Le complexe trimérique NF- $\kappa$ B est donc situé en aval des molécules EDARADD-TAB2-TAK1-TRAF6 et est activé par ces dernières suite à la fixation de l'EDA à EDAR [Courtney et coll., 2005 ; Morlon et coll., 2005]. Ce facteur de liaison à l'ADN a été identifié originellement dans les noyaux de cellules lymphocytaires B matures en tant que facteur nécessaire à l'expression des chaînes légères kappa des Immunoglobulines. Le facteur NF-kappaB est exprimé dans de nombreux autres types cellulaires et active la transcription de gènes variés codant pour des cytokines, des chimiokines, des facteurs de croissance ou des molécules d'adhésion [Baldwin, 1996]. Les principales cibles transcriptionnelles du facteur NF- $\kappa$ B activé sont des gènes impliqués dans la morphogenèse comme Sh, follistatine ou CTGF [Pummila et coll., 2007], le cycle cellulaire (cycline D1) et surtout la différenciation ostéoclastique (AP1, NFAT1, NFAT2) [Gohda et coll., 2005].

Sa fonction dans la biogenèse des dérivés ectodermiques et dans le maintien de l'homéostasie cutanée est de découverte plus récente. NF-kappaB régule la morphogenèse osseuse, l'ostéoclastogenèse, la prolifération kératinocytaire et présente un rôle anti-apoptotique [Schmidt-Ullrich et coll., 2006] De plus, NF-kappaB intervient dans la différenciation kératinocytaire et la mélanogenèse. NF-kappaB est un complexe hétéromérique composé de protéines et de kinases de la famille Rel [Fujita et coll., 1992]. Après un stimulus constitué par la liaison d'une cytokine, d'un facteur mitogène, d'une molécule de la famille TNF comme l'EDA, a lieu la phosphorylation par IKK1 et IKK2 activées par NEMO de l'inhibiteur de NF-kappaB, I $\kappa$ B. Ceci mène à une dissociation de I $\kappa$ B libérant ainsi le complexe NF-kappaB dimérique qui va faire l'objet d'une translocation nucléaire et jouer son rôle de facteur transcriptionnel [Fujita et coll., 1992; Kenwrick, 2002].

Les sous-unités monomériques du facteur NF- $\kappa$ B sont les facteurs de la famille Rel correspondant à un proto-oncogène viral identifié dans le virus de la Réticuloendothéliose [Baldwin et coll., 1996]. Il s'agit d'un rétro-virus responsable de leucémies animales. Les complexe homo ou hétérodimériques peuvent être constitués par 2 des 5 facteurs appartenant à la famille Rel regroupant les sous-unités : Rel A (p65), Rel B, c-Rel (Rel), NF-kappa-B1 (p50) et NF-kappa-B2 (p52) [Fujita et coll., 1992]. Ces sous-unités du facteur NF- $\kappa$ B sont caractérisées par la présence d'un domaine d'homologie Rel impliqué dans la liaison à l'ADN et l'activation transcriptionnelle NF- $\kappa$ B dépendante [Baldwin et coll., 1996]. Le domaine d'homologie Rel code également pour le site de dimérisation, ainsi que pour le signal de localisation nucléaire [Baldwin et coll., 1996]. L'inactivation

par Knock-out de ces différentes sous-unités monomériques de NF- $\kappa$ B mène à un phénotype immunitaire et osseux [Snapper et coll., 1996 ; Franzoso et coll., 1997]. Le phénotype du modèle murin double Knock-out p50/p52  $-/-$  est caractérisé par une létalité à 3-4 semaines de développement postnatal, un retard de croissance et une ostéopétrose [Franzoso et coll., 1997 ; Iotsova et coll., 1997]. La double inactivation des sous-unités monomériques de NF- $\kappa$ B, p50 et p52 mène à une absence d'éruption des incisives, caractéristiques de l'ostéopétrose, ainsi qu'à une augmentation généralisée de la radio-opacité des os longs et du complexe crânio-facial et une absence de cavités médullaires [Franzoso et coll., 1997].

L'analyse histologique des caractéristiques de l'ostéopétrose montre l'inclusion ostéo-cartilagineuse intra-médullaire chez les souris double knock-out p50/p52  $-/-$  et l'absence d'ostéoclastes matures multinucléés TRAP+ [Franzoso et coll., 1997]. Une absence des précurseurs ostéoclastiques TRAP+ est également associée au double Knock-out, montrant l'implication du facteur NF- $\kappa$ B dans les stades précoces de l'ostéoclastogenèse. L'inactivation isolée de p50 ou p52 ne mène néanmoins à aucune anomalie osseuse métabolique ou trouble du développement squelettique [Iotsova et coll., 1997].

Le phénotype ostéopétrotique est lié à un défaut intrinsèque de la lignée ostéoclastique, ce qui a été démontré par des expériences de co-culture entre ostéoblastes primaires et précurseurs spléniques de souris Wild-type ou double Knock-out p50/p52  $-/-$ . En effet, des ostéoclastes matures fonctionnels ne sont produits qu'à partir des précurseurs spléniques des souris Wild-type et non p50/p52  $-/-$  [Franzoso et coll., 1997]. Des macrophages matures F 4/80 + sont immunolocalisés au niveau de coupes de tissus spléniques et hépatiques des souris double Knock-out p50/p52, ce qui démontre que l'altération de la différenciation ostéoclastique se fait à un stade tardif de l'évolution de la lignée myélomonocytaire après divergence de la lignée macrophagique et ostéoclastique. Le phénotype ostéopétrotique des souris p50/p52  $-/-$  est supprimé après administration et transfert adoptif de cellules hépatiques fœtales Wild-type contenant des ostéoclastes et des précurseurs hématopoïétiques. En effet la formation d'une cavité médullaire et une éruption dentaire normale sont induits par administration de ces cellules hépatiques fœtales [Franzoso et coll., 1997]. La transplantation de cellules souches médullaires permet également la disparition du phénotype ostéopétrotique [Iotsova et coll., 1997], confirmant l'existence d'un défaut intrinsèque de la différenciation ostéoclastique à partir des précurseurs médullaires.

**Une anomalie de la différenciation ostéoclastique menant à un phénotype ostéopétrotique est donc associée à une inactivation de sous-unités du facteur NF- $\kappa$ B.**

Le complexe NF-kappaB est maintenu inactif dans le cytoplasme par liaison avec une protéine inhibitrice de la famille des IKB pour Inhibitor NF-kappaB formant ainsi une structure trimérique [Alkalay et coll. 1995]. Les facteurs IKB existent sous 6 différentes isoformes qui sont IKB $\alpha$ , IKB $\beta$ , IKB $\gamma$ , IKB $\delta$  et IKB $\varepsilon$  et BCL-3 [Beg et coll., 1993]. La séquestration cytoplasmique du complexe dimérique NF-kappaB par un facteur IKB, résulte en un masquage de la séquence de localisation nucléaire [Beg et coll., 1993]. La protéine IKB, maintenant NF- $\kappa$ B sous forme cytoplasmique inactive est phosphorylée lors de l'activation de la voie de signalisation et la liaison de l'EDA à son Récepteur EDAR, entraînant une phosphorylation de IKB par les kinases IKK et sa polyubiquitination et sa dégradation protéasomique au niveau du protéosome 26S [Courtney et coll., 2005].

## 2.5 LE FACTEUR NF- $\kappa$ B ESSENTIAL MODULATOR (NEMO)

Le complexe moléculaire intervenant dans l'activation de NF- $\kappa$ B par les kinases IKK est l'ensemble NEMO (NF- $\kappa$ B Essential Modulator)/IKK (Inhibitor Kappa Kinase). Il s'agit d'une structure hétérotrimérique constituée de 2 protéines kinases, IKK1 et IKK2, phosphorylant après activation IKB, entraînant sa poly ubiquitination et sa dégradation protéasomique [Alkalay et coll., 1995 ; Courtney et coll., 2005]. En plus de ces 2 kinases, ce complexe est constitué par une protéine appelée NEMO ou IKK $\gamma$  sans activité catalytique, qui est le modulateur essentiel de NF-kappaB [Beg et coll., 1993]. La découverte de ce complexe moléculaire phosphorylant IKB s'est faite par fractionnement biochimique et électrophorèse, permettant l'identification d'un complexe de haut poids moléculaire d'environ 800kDa, comprenant 2 sous-unités catalytiques (IKK1 et IKK2) et une sous-unité régulatrice (NEMO ou IKK $\gamma$ ) [Makris et coll., 2002]. NEMO est une molécule régulatrice dont la mutation entraîne un phénotype de Dysplasie Ectodermique avec immunodéficiency et ostéopétrose ou avec anomalies rétiniennes et neurologiques associées dans le cadre d'*Incontinentia Pigmenti* [Smahi et coll., 2002]. Les mutations hypomorphiques du gène *IKBK* codant pour NEMO sont associées à une forme de dysplasie ectodermique avec ostéopétrose et immunodéficiency, alors que les mutations amorphiques sont impliquées dans *Incontinentia Pigmenti* [Doffinger et coll., 2001 ; Carrol et coll., 2003 ; Niehues et coll., 2004].

*Incontinentia Pigmenti* est une génodermatose dominante liée à l'X, létale durant la période anténatale chez les individus mâles, et caractérisée par un phénotype dermatologique sévère sous forme de lésions vésiculeuses, verruqueuses et d'hyper-pigmentation selon les lignes de Blashko [Smahi et coll., 2002 ; Zou et coll., 2007]. Un réarrangement génomique complexe caractérise 85% des patients avec *Incontinentia Pigmenti*, sous forme d'une large délétion de l'exon 4 à l'exon 10 inhibant l'activation de NF- $\kappa$ B par NEMO/IKK [Aradhya et coll., 2001]. Un phénotype d'éruption

cutanée pigmentée, d'érythrodermie, d'alopecie, d'immunodéficience, d'anomalies dentaires et de proéminence frontale a été décrit chez une patiente présentant une mutation hypomorphique du gène *IKBKG* (Inhibitor Kappa B kinase gamma gene) [Mancini et coll., 2008]. Le phénotype caractéristique d'*Incontinentia Pigmenti* avec des anomalies cutanées, neurologiques et phanériennes a été décrit en rapport avec de larges délétions du gène *NEMO* (exons 4-10), mais également des délétions d'un seul nucléotide ou un polymorphisme [Zou et coll., 2007]. Une mutation hypomorphique du gène *NEMO* a été également rapportée dans un cas d'immunodéficience sans dysplasie ectodermique [Niehues et coll., 2004]. Une forte sensibilité des cellules de patients avec *Incontinentia Pigmenti* à l'apoptose induite par TNF montre l'importance de l'apoptose dans les lésions dermatologiques et les fonctions anti-apoptotiques de NEMO/IKK [Smahi et coll., 2002].

NEMO présente également des fonctions moléculaires durant l'odontogenèse, démontrées par le phénotype molaire de souris avec Knock-out conditionnel épithélial de NEMO [Courtney et coll., 2005]. Le phénotype molaire de ce modèle murin est fortement similaire au phénotype dentaire du modèle Tabby avec hypotrophie du germe des molaires et anomalie de la morphologie cuspidienne [Courtney et coll., 2005]. Cette correspondance phénotypique entre le modèle Knock-out NEMO et Tabby montre l'implication du facteur NEMO dans la voie de transduction de l'EDA.

La mutation hypomorphique du facteur NEMO menant à une inhibition partielle de l'activation de NF- $\kappa$ B par NEMO est associée une Dysplasie Ectodermique syndromique avec ostéopétrose et immunodéficience associées [Doffinger et coll., 2001 ; Courtois et coll., 2001 ; Dupuis-Girod et coll., 2002 ; Vinolo et coll., 2006]. Le phénotype squelettique est caractérisé par une radio-densité corticale marquée avec réduction de l'espace médullaire au niveau des os longs, des vertèbres, de l'os iliaque et particulièrement au niveau de la voûte crânienne [Doffinger et coll., 2001]. Les analyses histologiques de biopsies osseuses ont montré des modifications structurales osseuses caractéristiques de l'ostéopétrose avec des trabéculations osseuses denses, larges et irrégulières [Doffinger et coll., 2001]. Ces trabéculations osseuses hypertrophiques sont caractérisées par la présence d'un îlot central cartilagineux, ce qui se rapproche du phénotype osseux associé au modèle murin Tabby avec présence d'inclusions cartilagineuses intra-osseuse [Hill et coll., 2002]. L'analyse par microscopie électronique a montré la présence d'ostéoclastes sans anomalies de nombre ou de morphologie cellulaires, les analyses de la fonction ostéoclastique ou de la bordure en brosse impliquée dans la résorption osseuse n'ayant pas été réalisées [Dupuis-Girod et coll., 2002]. La biopsie médullaire a montré d'existence de cellules progénitrices de l'ensemble des lignées hématopoïétiques, l'ensemble de ces résultats cliniques et biologiques étant en faveur d'une ostéopétrose de type 2 [Dupuis-Girod et coll., 2002].

La mutation NEMO est donc associée à des altérations de la fonction ostéoclastique, plutôt que de la différenciation ostéoclastique. Ce phénotype ostéoclastique s'approche du phénotype observé chez les souris TRAF6 *-/-*, caractérisées par la présence d'ostéoclastes non-fonctionnels, plutôt que du phénotype associé aux souris p50/p52 *-/-* avec absence d'ostéoclastes [Franzoso et coll., 1997 ; Lomaga et coll., 1999 ].

**Le phénotype squelettique associé à la mutation de NEMO confirme donc l'existence d'anomalies de la différenciation ostéoclastique associées à un dysfonctionnement de la voie EDA-NEMO/IKK-NF-κB. Une mutation plus en amont au niveau de l'EDA, pourrait entraîner la même altération de la signalisation EDA-NF-κB et le même phénotype ostéopétrotique.**

## **2.6 PATHOLOGIES METABOLIQUES OSSEUSES AVEC DYSFONCTIONNEMENT DE LA VOIE NF-κB**

La voie NF-κB et les processus d'ostéoclastogenèse et de différenciation ostéoclastique sont altérés dans différentes pathologies métaboliques osseuses comme la maladie de Paget ou l'ostéolyse familiale, montrant le rôle essentiel de cette voie de signalisation dans le métabolisme osseux [Theoleyre et coll., 2004 ; Bezerra et coll., 2005 ; Hui et coll., 2005 ; Whyte et coll., 2006, Dougall et coll., 2006 ; Jin et coll., 2007].

En effet RANKL-OPG-NF-κB constitue le système régulateur principal du remodelage osseux et de l'activité ostéoclastique, des mutations avec gain de fonction, situées à différents niveaux de la voie de transduction, entraînant un phénotype osseux caractéristique avec augmentation du remodelage osseux [Lucas et coll., 2006]. En effet, des mutations avec duplication en tandem du gène codant pour le Récepteur RANK appelé *TNFRSF11A*, entraînant une activation de la voie RANK-NF-κB sont impliquées dans des phénotypes d'ostéolyse familiale, de maladie de Paget type 2 et d'hyperphosphatasie squelettique expansive [Whyte et coll., 2006]. Le même phénotype osseux est associé à ces différentes pathologies métaboliques osseuses, caractérisées par un remodelage osseux accéléré et des lésions ostéolytiques, dont la distribution topographique permet le diagnostic différentiel entre maladie de Paget et l'ostéolyse familiale expansive [Hughes et coll., 2000]. En effet, les lésions osseuses épargnent le squelette axial dans l'ostéolyse familiale contrairement à la maladie de Paget [Hughes et coll., 2000].

Les mutations avec insertion du récepteur RANK sont localisées au niveau du peptide signal impliqué dans le clivage protéolytique de RANK résultant en une accumulation intracellulaire de RANK, une activation constitutive du récepteur et une activation excessive de NF-κB [Hughes et coll., 2000].

La mutation du gène codant pour l'inhibiteur endogène de RANKL, OPG, est également à l'origine d'un phénotype osseux avec augmentation du remodelage, dans le cadre de la plupart des maladies de Paget juvéniles [Whyte et coll., 2006]. En effet, cette pathologie autosomique récessive, trouve son étiologie moléculaire dans l'inactivation de l'OPG et donc la stimulation excessive de la voie RANKL-NF-κB [Whyte et coll., 2006].

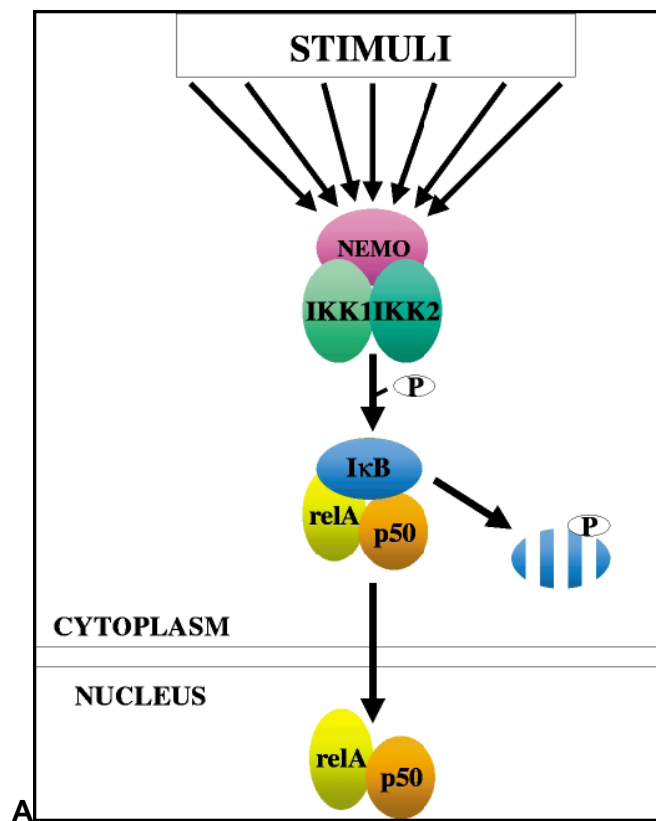
Une altération moléculaire plus en aval de la voie de signalisation, avec mutation d'une protéine de liaison au facteur NF-κB, le sequestosome 1 (p62) constitue l'étiologie moléculaire d'un tiers des maladies de Paget familiales et d'une minorité des maladies de Paget sporadiques [Kurihara et coll., 2007]. En effet, la transfection cellulaire de p62 mutée entraîne une hyper-réactivité des précurseurs ostéoclastiques à RANKL et une augmentation de l'activation de NF-κB. Des lésions ostéolytiques et un nombre élevé d'ostéoclastes sont associés *in-vivo* au modèle murin avec surexpression du *sequestosome 1* muté [Kurihara et coll., 2007].

Des altérations moléculaires de la dégradation du facteur IκB, impliqué dans la séquestration cytoplasmique du facteur NF-κB, sont liées à la mutation du gène *VCP*, codant pour la Valosin-Containing Protein menant une forme de maladie de Paget syndromique appelé IBMPFD pour «Inclusion Body Myopathy-Paget disease-Fronto-temporal Dementia » [Guinto et coll., 2007]. Les mutations, à l'origine de ce syndrome de démence frontotemporale avec myopathie et maladie de Paget sont localisées au niveau des sites de poly-ubiquitination de IκB, entraînant une dégradation excessive de IκB et une activation de NF-κB [Guinto et coll., 2007].

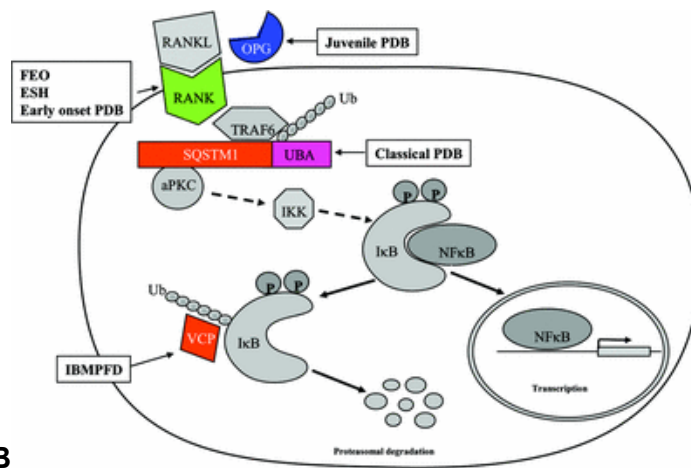
Un phénotype de dysplasie ectodermique avec ostéosclérose centrale a été décrit, dans le cadre d'un syndrome d'un syndrome IBIDS (Ichtyose, brittle hair, cataract and short stature), avec une dysplasie piliaire caractéristique de la trichithiodystrophie [Civitelli et coll., 1989]. Les analyses histopathologiques ont exclu le diagnostic d'ostéopétrose, mais ont mis en évidence un ralentissement de remodelage osseux. Ce syndrome était caractérisé par une ostéosclérose centrale et une ostéopénie périphérique [Civitelli et coll., 1989], montrant l'existence d'associations entre anomalies ectodermiques et métaboliques osseuses.

**La physiopathologie de ces pathologies osseuses avec anomalies du remodelage osseux montre bien le rôle de la voie RANKL-NF-κB dans le métabolisme osseux. Une altération de la signalisation NF-κB, avec perte de fonction liée à la mutation *EDA*, pourrait donc être à l'origine d'un phénotype osseux inverse avec augmentation de la densité osseuse.**





A



B

**Fig 14** : (A) Mécanismes moléculaires impliqués dans l'activation de NF-κB par le complexe moléculaire NEMO/IKK [selon Smahi et coll., 2002].

(B) Mécanismes moléculaires avec altérations de la voie RANKL-NF-κB impliqués dans la maladie de Paget et les pathologies métaboliques osseuses associées [selon Daroszewska et coll., 2005].

---

### **3. LE DEVELOPPEMENT CRANIO-FACIAL ET OSSEUX : IMPLICATIONS DE LA VOIE EDA-NF-κB**

---

#### **3.1 ROLE DE LA VOIE EDA-NF-κB DANS L'INDUCTION NEURALE ET LA DIFFERENCIATION DES CRETES NEURALES CEPHALIQUES**

La différenciation et le développement des structures crânio-faciales, notamment des éléments squelettiques maxillaires et mandibulaires, sont basés sur des processus complexes faisant intervenir les cellules des crêtes neurales céphaliques, ainsi que différentes molécules de signalisation et gènes homéotiques, pouvant être en interaction avec l'EDA [Ishimura et coll., 2000 ; Cobourne et coll., 2003 ; Raible, 2006 ; Pummila et coll., 2007].

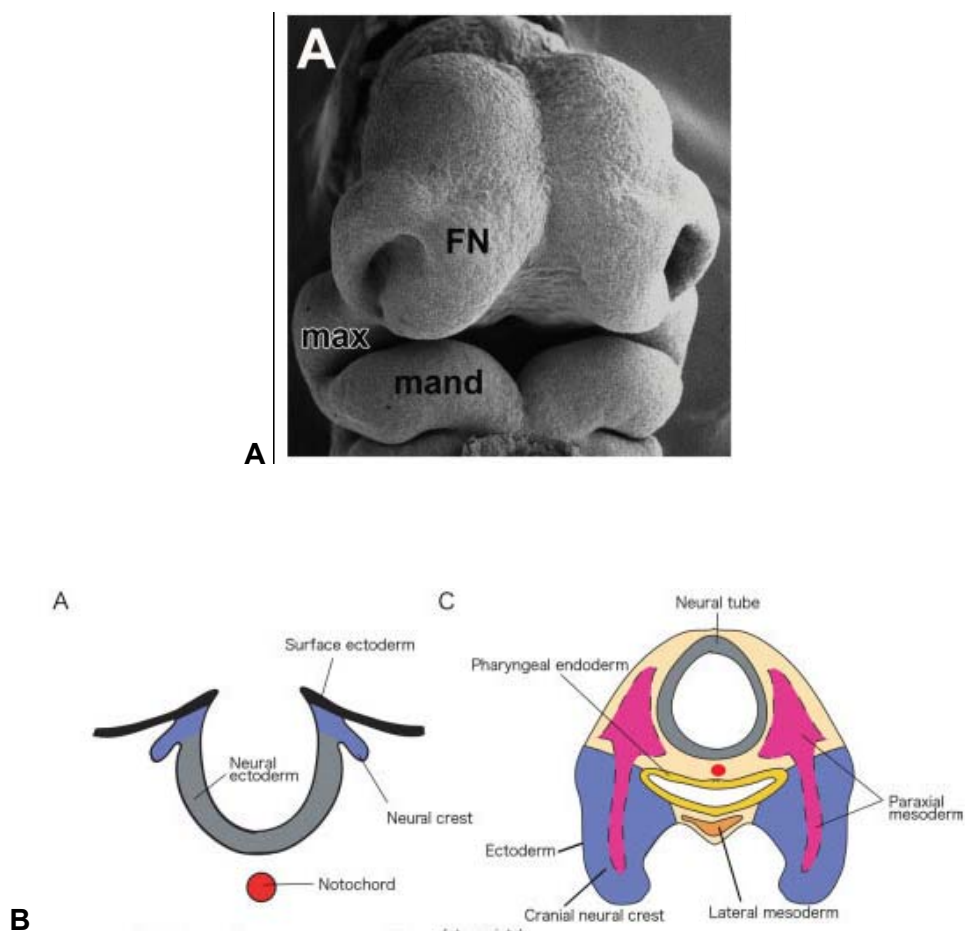
Les cellules des crêtes neurales céphaliques chez les vertébrés constituent une population de cellules pluripotentes se différenciant au niveau de la jonction entre la partie latérale de la plaque neurale et l'ectoderme et migrant vers les différents arcs branchiaux et le processus fronto-nasal durant les stades précoces de l'embryogenèse [Lumsden et coll., 1991 ; Basch et coll., 2006 ; Chai et coll., 2006]. Les cellules des crêtes neurales des 3 premiers rhombomères r 1-3, migrent à partir de la région latérale du tube neural, en direction du processus fronto-nasal et du premier arc branchial constitué des processus maxillaire et mandibulaire [Lumsden et coll., 1991].

Le premier arc branchial, à l'origine des éléments squelettiques crânio-faciaux est Hox-négatif et cette absence d'expression des gènes Hox est nécessaire à la différenciation des différents éléments squelettiques, mais implique d'autres molécules de signalisation comme *Fgf8*, *Wnt* ou *BMP* et certains gènes homéotiques comme *Msx* ou *Lhx* [Trumpp et coll., 1999; Shigetani et coll., 2000 ; James et coll., 2002 ; Cobourne et coll., 2003 ; Knight et Schilling, 2006 ; Nie et coll., 2006 ; Sasaki et coll., 2006].

Les cellules des crêtes neurales sont caractérisées par une plasticité et donc influencées par des signaux moléculaires produits par leur environnement, et notamment par l'ectoderme branchial, permettant la différenciation des éléments squelettiques crânio-faciaux et la détermination de leur morphologie et taille [Le Douarin et coll., 2004]. De plus, la spécification précoce de l'ectoderme orofacial et la différenciation du domaine ectodermique proximal et distal, après interaction avec l'endoderme pharyngien, influence de façon importante la migration vers les arcs branchiaux des cellules des crêtes neurales céphaliques [Miletich et coll., 2004]. L'ectoderme crânio-facial joue un

rôle prépondérant dans la spécification des cellules des crêtes neurales et la morphogenèse crânio-faciale.

Ainsi, une dyshistogenèse ectodermique, liée à la mutation *EDA*, pourrait être à l'origine d'altérations des interactions entre l'ectoderme et les cellules des crêtes neurales céphaliques et, par conséquent, de certaines dysmorphies crânio-faciales associées au phénotype de la DEX. De plus, l'*EDA* a été immunolocalisée, durant le développement embryonnaire humain, au niveau des cellules neuroectodermiques, qui se différencieront en cellules des crêtes neurales [Montonen et coll., 1998]. L'*EDA* semble donc jouer un rôle important dans le développement neuroectodermique et une altération de ses fonctions liées à la mutation *EDA*, pourrait altérer la différenciation des cellules des crêtes neurales et la morphogenèse crânio-faciale.



**Fig 15 :** (A) Processus fronto-nasal et premier arc branchial avec processus maxillaire et mandibulaire peuplés par les cellules des crêtes neurales céphaliques [selon Chai et coll., 2006].

(B) Crêtes neurales se développant sur la partie latérale de plaque neurale et zones d'interactions entre ectoderme, mésenchyme dérive des crêtes neurales et endoderme pharyngien [selon Chai et coll., 2006].

### 3.2 INTERACTIONS MOLECULAIRES ENTRE LA VOIE EDA-NF-KB ET LES FACTEURS WNT ET BMP- Msx

Les cellules des crêtes neurales, faisant l'objet d'une transformation épithélio-mésenchymateuse, constituent l'ectomésenchyme des arcs branchiaux et se différencient en cellules pigmentaires, cellules ganglionnaires du système nerveux périphérique et éléments squelettiques et cartilagineux crânio-faciaux [Labonne et coll., 1999]. Les mécanismes d'induction neurale, de différenciation, de prolifération et de migration des cellules des crêtes neurales font intervenir différentes voies de signalisation dont les FGF, BMP-Msx, Wnt et l'acide rétinoïque [Knight et Schilling, 2006 ; Basch et coll., 2006 ; Barlow et coll., 1999; Bei et coll., 2000 ; Aybar et coll., 2002 ; Han et coll., 2003 ; Ramos et Robert, 2005 ; Levi et coll., 1986]. Le facteur Wnt, semble être un des éléments essentiels dans l'induction neurale, en association avec d'autres molécules de signalisation comme les BMP, impliquées dans la différenciation de la région latérale de la plaque neurale et donc des crêtes neurales [Tribulo et coll., 2003]. En effet, l'induction de *Msx1* au niveau des futures crêtes neurales par *Bmp4* est nécessaire aux processus d'induction neurale et à l'expression de marqueurs moléculaires des crêtes neurales comme *Snail*, *Slug* ou *FodD3* [Tribulo et coll., 2003]. *Bmp2* et *Bmp4* sont exprimés au niveau des 2 premiers arcs branchiaux et du processus fronto-nasal, intervenant donc dans la différenciation précoce des éléments crânio-faciaux [Francis-West et coll., 1998 ; Basch et coll., 2006].

Une concentration spécifique intermédiaire et la mise en place d'un gradient de *Bmp4* sont impliqués dans l'induction neurale, démontrant le rôle de la voie de signalisation BMP-*Msx* dans la différenciation des éléments crânio-faciaux. En effet, l'inhibition *in vitro* de l'activité *Msx* induite par l'expression de dominants négatifs de *Msx*, a mené à la disparition du territoire des marqueurs moléculaires des crêtes neurales, inversement l'activation de *Msx* a entraîné une expansion des cellules des crêtes neurales [Tribulo et coll., 2003]. L'importance de la voie BMP-*Msx* a également été démontrée par des modèles murins surexprimant, un inhibiteur de BMP appelé *Noggin* caractérisé par un phénotype squelettique avec anomalies des dérivés des arcs branchiaux et de la région occipitale [Kanzler et coll., 2000]. Les ganglions crâniens, dérivés des cellules des crêtes neurales, en particulier les ganglions du IX<sup>ème</sup> et X<sup>ème</sup> nerf crânien sont affectés par la transgénèse de *Noggin*, démontrant l'importance de la voie BMP-*Msx* dans la différenciation des dérivés des crêtes neurales [Kanzler et coll., 2000]. Le phénotype des embryons de souris Knock-out *Bmp2* -/- est caractérisé par l'absence d'arcs branchiaux et l'absence de cellules migrantes des crêtes neurales, confirmant le rôle de la voie de signalisation BMP dans la formation des cellules des crêtes neurales [Kanzler et coll., 2000].

La voie BMP-*Msx* semble être à l'origine de la cascade génétique impliquée dans l'acquisition de l'identité moléculaire et de la morphologique des crêtes neurales céphaliques. La voie BMP-*Msx* intervient aussi bien dans la différenciation des crêtes neurales que dans les interactions épithélio-mésenchymateuses au sein des arcs branchiaux, définissant ainsi leurs dérivés squelettiques [Kanzler et coll., 2000].

La voie de signalisation de l'EDA est caractérisée par des interactions avec la voie BMP-*Msx*, *via* deux inhibiteurs de BMP appelé Ccn2/CTGF (CCN family protéine 2/Connective Tissue Growth Factor) et Follistatine [Pummila et coll., 2007]. En effet, un rôle d'inhibition de Bmp4 par l'EDA a été montré sur des explants dentaires en culture, l'EDA exogène inhibant la production d'améloblastine induite par Bmp4 [Pummila et coll., 2007]. De plus, l'application d'EDA exogène sur des explants cutanés induit la production de transcrits de Ccn2/CTGF et de Follistatine. L'induction rapide de Ccn2/CTGF suggère qu'il s'agit d'une cible transcriptionnelle directe de la voie EDAR-NF- $\kappa$ B [Pummila et coll., 2007]. Par ailleurs, des expériences d'hybridation *in situ* ont montré la co-localisation du récepteur EDAR et Ccn2 au niveau des placodes ectodermiques en formation.

De plus, des domaines d'expression similaire de la sous-unité monomérique c-rel de NF- $\kappa$ B et *msx1* ont été démontrés par hybridation *in situ* durant le développement squelettique embryonnaire [Bushdid et coll., 2001], suggérant l'existence d'interactions entre NF- $\kappa$ B et *msx1*. Le facteur NF- $\kappa$ B est nécessaire et régule l'expression de *msx-1*, l'administration d'un inhibiteur trans-dominant de NF- $\kappa$ B (rétrovirus RCAS- $\alpha$  $\Delta$ N) entraînant une diminution de l'expression de *msx1* [Bushdid et coll., 2001].

La région promotrice 5' du gène codant pour *msx1* contient trois sites de liaison au facteur NF- $\kappa$ B appelé  $\kappa$ B1,  $\kappa$ B2 et  $\kappa$ B3, la protéine c-rel recombinante étant caractérisée par une liaison spécifique préférentielle au site  $\kappa$ B3 mais se lie néanmoins à  $\kappa$ B2 et  $\kappa$ B1 [Bushdid et coll., 2001].

**L'existence d'interactions moléculaires étroites entre la voie BMP-*Msx* et EDA-NF- $\kappa$ B suggère que la mutation *EDA*, modifiant la signalisation NF- $\kappa$ B, pourrait être à l'origine de perturbations de l'induction neurale et de la différenciation des dérivés squelettiques crânio-faciaux des crêtes neurales.**

Des interactions entre EDA et la voie de signalisation Wnt- $\beta$ -caténine-Lef1, importante dans les processus d'induction neurale, ont été décrites [Kere et coll., 1996 ; Tucker et coll., 2000], en raison de l'existence d'un site de liaison Lef-1 associé au promoteur du gène *EDA* [Kere et coll., 1996]. La voie Wnt- $\beta$ -caténine-Lef1 induit donc la transcription du gène codant pour l'EDA. Néanmoins, aucune modification de l'expression des facteurs EDA et EDAR durant la morphogenèse dentaire

des souris Knock-out *Lef1* *-/-*, démontrant que *EDA/EDAR* ne sont pas situés en aval de *Lef1* [Tucker et coll., 2000].

Ces interactions moléculaires étroites entre *Wnt* et *EDA*, médiées par  $\beta$ -caténine-*Lef1* pourraient donc être modifiées par la mutation *EDA*, perturbant la différenciation des cellules des crêtes neurales et la morphogenèse crânio-faciale.

La voie de signalisation *Wnt*- $\beta$ -caténine est également impliquée dans les processus de différenciation ostéogénique à partir des cellules progénitrices médullaires, en stimulant l'ostéoblastogenèse et en inhibant l'adipogenèse [Bennet et coll., 2005]. Le modèle murin *FABP4-Wnt10*, surexprimant *Wnt* est caractérisé par un phénotype squelettique avec augmentation de la masse osseuse, augmentation de la densité minérale osseuse et du nombre de trabécules osseuses mise en évidence par micro-tomographie [Bennet et coll., 2005]. *Wnt* stimule l'ostéoblastogenèse en induisant l'expression de facteurs transcriptionnels ostéoblastogéniques comme *Runx2*, *Dlx5* et ostéix [Bennet et coll., 2005]. En effet, le facteur *Runx2* est essentiel aux processus de différenciation ostéoblastique, en stimulant l'expression de différentes molécules matricielles osseuses comme le collagène I, l'ostéopontine, l'ostéocalcine et la Bone Sialoprotein [Bronckers et coll., 2003]. Ainsi, le facteur *Runx2* est immunolocalisé durant l'ossification membranaire chez la souris au niveau des pré-ostéoblastes du périoste, des ostéoblastes et des ostéocytes de la voûte crânienne et de la mandibule [Bronckers et coll., 2003]. Les zones crânio-faciales d'ossification endochondrale au niveau de la base du crâne et du cartilage de Meckel expriment également le facteur *Runx2*, montrant les implications de ce facteur ostéogénique dans le développement crânio-facial [Bronckers et coll., 2003].

Inversement, le modèle murin Knock-out *Wnt10* *-/-* avec inactivation de *Wnt10* est caractérisé par un phénotype osseux avec réduction de masse osseuse, de la densité minérale osseuse et du nombre de trabécules osseuses [Bennet et coll., 2005]. L'ostéogenèse crânio-faciale et la différenciation ostéogénique pourraient donc également être perturbées par la mutation *EDA*, de par les interactions moléculaires entre l'*EDA* et la voie de *Wnt*- $\beta$ -caténine. En effet, l'*EDA* a été localisé durant le développement osseux crânio-facial au niveau des ostéoblastes du crâne sécrétant la matrice osseuse dès la 16<sup>ème</sup> semaine du développement fœtal humain, suggérant l'implication de la voie *EDA*-NF- $\kappa$ B dans le développement squelettique crânio-facial [Montonen et coll., 1998].

### 3.3 INTERACTIONS ENTRE EDA ET FGF

La différenciation des éléments squelettiques proximaux et distaux du 1<sup>er</sup> arc branchial nécessite une balance entre les voies de signalisation FGF et BMP exprimés au niveau de l'ectoderme oro-facial [Crump et coll., 2004 ; Chai et Maxson, 2006]. En effet, Fgf8 ectodermique est une molécule de signalisation essentielle à la différenciation des éléments du 1<sup>er</sup> arc, ce qui est démontré par le phénotype du modèle Knock-out Fgf8 *-/-*, caractérisé par l'absence de l'ensemble des structures squelettiques du 1<sup>er</sup> arc branchial [Trumpp et coll., 1999].

La signalisation FGF est impliquée dans le développement des éléments proximaux du 1<sup>er</sup> arc branchial, induisant l'expression de gènes homéotiques comme *Barx1*, *Lhx6* et *Lhx7* au niveau du mésenchyme sous jacent [Chai et Maxson, 2006]. La voie BMP-*Msx* régule, quant à elle, le développement des éléments distaux du 1<sup>er</sup> arc branchial. Les cellules post-migrantes des crêtes neurales sont donc soumises à une régulation complexe par les voies BMP et FGF d'origine ectodermique, mettant en évidence le rôle essentiel de la régulation ectodermique dans la différenciation des crêtes neurales [Chai et Maxson, 2006]. La régionalisation de l'épithélium oral correspond donc à l'expression spatiale de molécules comme Fgf8 et Bmp4 [Kettunen et Thesleff, 1998, Haworth et coll., 2004]. De plus, un pré-patterning des cellules épithéliales orales est décrit, avec une localisation spécifique de ces cellules au niveau de l'ectoderme durant le développement embryonnaire, avant la migration des cellules des crêtes neurales et la différenciation des arcs branchiaux [Shigetani et coll., 2000; Haworth et coll., 2004]. La signalisation ectodermique précoce induit l'expression de gènes homéotiques au niveau mésenchymateux intervenant dans la différence osseuse et cartilagineuse oro-faciale [Haworth et coll., 2004]. Ces données expérimentales confirment le rôle essentiel de l'ectoderme et de ses molécules de signalisation dans la morphogenèse crânio-faciale. Une anomalie des fonctions ectodermiques, liées à la mutation de l'EDA et aux altérations des interactions entre l'EDA et autres molécules de signalisation, pourrait donc influencer sur les processus précoces du développement crânio-facial.

Des interactions entre la voie EDA-NF- $\kappa$ B et FGF ont été décrites [Pispa et coll., 1999], suggérant des altérations de la différenciation des éléments du 1<sup>er</sup> arc branchial par la mutation *ED1* induisant une anomalie de la signalisation EDA-NF- $\kappa$ B.

En effet, une réversion *invitro* du phénotype dentaire Tabby, lié à la mutation du facteur Ta-EDA, a été obtenue par administration de Fgf-10 exogène sur des explants dentaires Tabby, alors que le facteur EGF n'a aucun effet sur le phénotype Tabby [Pispa et coll., 1999]. Une

convergence entre les 2 voies de signalisation EDA et FGF est donc évoquée, probablement *via* le facteur transcriptionnel NF- $\kappa$ B [Pispa et coll., 1999]. De plus, le facteur NF- $\kappa$ B est impliqué dans la régulation de l'expression de FGF qui est TNF-dépendante, durant le développement embryonnaire des membres [Bushdid et coll., 1998].

**Les interactions entre EDA et FGF durant le développement embryonnaire pourraient donc être altérées par la mutation de l'EDA, entraînant une anomalie de la différenciation des éléments squelettiques du 1<sup>er</sup> arc branchicoll.**

Le développement squelettique crânio-facial est probablement altéré par la mutation de l'EDA, la voie EDA-NF- $\kappa$ B se situant au centre d'interactions moléculaires avec les facteurs BMP-*Msx*, FGF et Wnt. Ces molécules de signalisation sont essentielles dans les processus de différenciation et de migration des crêtes neurales céphaliques, intervenant donc dans les différentes étapes de morphogenèse du massif crânio-facial.

### **3.4 EDA/TA ET DEVELOPPEMENT SQUELETTIQUE MANDIBULAIRE**

L'EDA est également impliquée dans le développement des structures cartilagineuses et osseuses mandibulaires [Tucker et coll., 2000]. La morphogenèse mandibulaire est caractérisée par la présence d'une structure cartilagineuse guidant le développement embryonnaire de la mandibule appelé cartilage de Meckel localisé au sein de l'arc mandibulaire du 1<sup>er</sup> arc branchial [Frommer et coll., 1971]. L'ectomésenchyme de l'arc mandibulaire est constitué de cellules des crêtes neurales post-migrantes et sa morphogenèse fait également intervenir des interactions entre l'ectoderme oral sécrétant des molécules comme FGF, TGF $\beta$  ou BMP et l'ectomésenchyme dérivé des crêtes neurales [Courtney et coll., 2005]. La croissance du cartilage de Meckel se fait selon trois zones spécifiques, la région antérieure formant la symphyse par ossification enchondrale, la région postérieure se différenciant en structures osseuses de l'oreille interne et la région intermédiaire occupant la plus grande portion du cartilage de Meckel [Frommer et coll., 1971]. La région intermédiaire du cartilage de Meckel fait l'objet d'une résorption par hypertrophie et dégénérescence chondrocytaire faisant intervenir des cellules multinuclées TRAP+ [Frommer et coll., 1971]. Le facteur Ta (EDA) a été localisé par hybridation *in-situ* au niveau de la mandibule et du cartilage de Meckel durant le développement embryonnaire murin [Tucker et coll., 2000]. Cette expression osseuse et cartilagineuse du facteur Ta durant le développement mandibulaire suggère l'implication de la voie EDA-NF- $\kappa$ B dans la morphogenèse mandibulaire et la possibilité d'altérations liées à la mutation ED1.



---

#### **4. THERAPEUTIQUES IMPLANTAIRES DANS LA DEH**

---

Les tableaux phénotypiques dentaires associés aux DEH avec oligodontie sévère ou anodontie correspondent à une indication de thérapeutiques implantaires précoces [Bergendal et coll., 1991 ; Guckes et coll., 2002 ; Clauss, 2005, Kramer et coll., 2007 ; Bergendal et coll., 2008]. Généralement les thérapeutiques implantaires sont indiquées pour des patients ayant achevé leur croissance squelettique, étant donné les risques de complications associées à la mise en place d'implants ostéo-intégrés en cours de croissance dento-squelettique [Kramer et coll., 2007]. Les principaux risques de complications sont une lésion des germes dentaires en cours de minéralisation, une perturbation de l'éruption dentaire et une inhibition de la croissance squelettique crânio-faciale dans le sens transversal ou sagittal [Kramer et coll., 2007]. Néanmoins, les tableaux d'oligodontie et d'anodontie syndromiques, dans le cas des DEH, ne peuvent pas être systématiquement pris en charge par une réhabilitation prothétique pédiatrique maxillo-mandibulaire conventionnelle. Dès 1991, une équipe a décrit l'implantation précoce dans la région symphysaire mandibulaire d'un patient atteint de DEX, avec la mise en place de 2 implants chez un patient âgé de 6 ans dans un contexte d'atrophie osseuse marquée. La première conférence de consensus traitant des thérapeutiques implantaires précoces de la DEX s'est tenue en 1996 et est intitulée « Consensus conference on oral implants in young patients ». L'hypotrophie osseuse alvéolaire et basale, notamment mandibulaire, associée aux DEH est un facteur anatomique défavorable à la stabilisation et la rétention prothétique [Bergendal et coll., 2008]. L'hypotrophie osseuse peut être à l'origine d'une instabilité et d'intolérance prothétique chez l'enfant [Bergendal et coll., 2008]. La mise en place d'implants ostéo-intégrés en cours de croissance dento-squelettique n'est pas une pratique clinique de routine.

Ces thérapeutiques implantaires, aussi bien chez les patients en cours de croissance ou adultes, nécessitent une évaluation du phénotype osseux associé aux DEH.

# PHENOTYPE DENTAIRE ET OSSEUX DU MODELE EXPERIMENTAL

## MURIN DE DEX : LA SOURIS TABBY

Le souris Tabby est l'équivalent murin phénotypique de la DEX chez l'homme et est caractérisé par des anomalies du développement des dérivés ectodermiques (dents, phanères, glandes exocrines), présentant une dystrophie ou une agénésie caractéristiques [Falconer, 1952 ; Gruneberg, 1971]. Cette mutation spontanée a été décrite initialement par Falconer en 1952. Chez ce modèle murin, des défauts touchant aussi bien des glandes exocrines, les glandes lacrymales, sudoripares ou sub-mandibulaires [Grüneberg, 1971]. Les anomalies dentaires liées à la mutation *Ta* touchent aussi bien la région molaire que la région incisive [Miard et coll., 1999, Peterkova et coll., 2002 ; Risnes et coll., 2005].

---

### 1. PHENOTYPE DENTAIRE DU MODELE TABBY

---

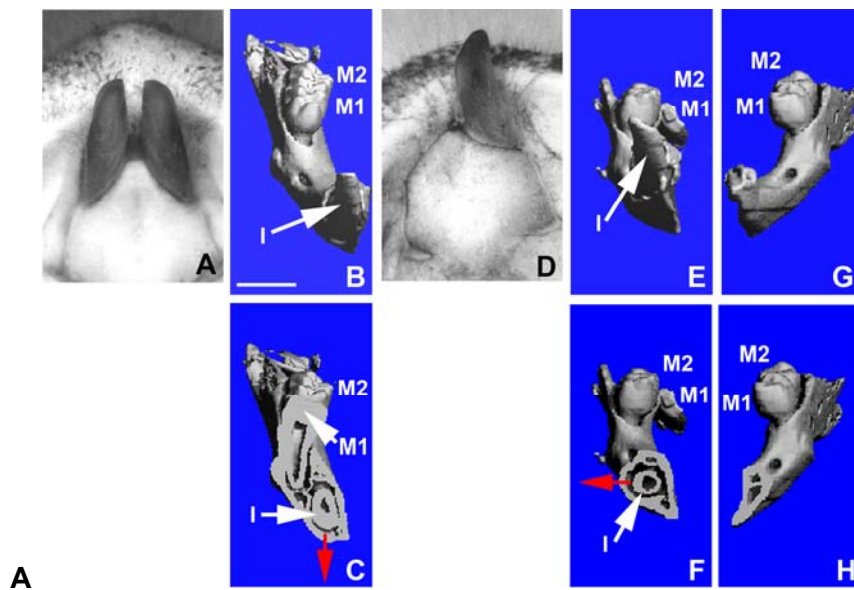
Le phénotype dentaire de la souris Tabby associe des anomalies de morphologie, de taille, de position et de nombre des molaires et incisives [Miard et coll., 1999; Kristenova et coll., 2002]. Ce phénotype dentaire est lié à une altération de l'Enamel Knot primaire, centre morphogénétique précoce important [Jernvall et coll., 1994], ainsi qu'à des défauts de la segmentation de la lame dentaire et des phénomènes d'apoptose durant l'odontogenèse [Kristenova et coll., 2002].

#### Développement des incisives inférieures Tabby

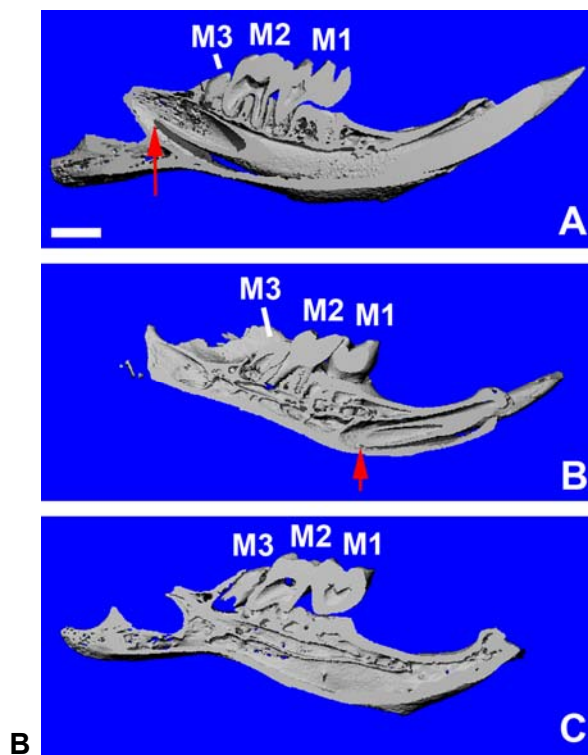
Des analyses morphologiques ont été réalisées, à partir de coupes histologiques et de reconstructions tridimensionnelles de l'épithélium dentaire, au niveau des incisives Tabby en cours de développement. Ce travail a montré une réduction de la taille de l'organe de l'émail, un retard de cytodifférenciation et une modification du rapport corono-radulaire [Miard et coll., 1999]. Dès ED 13.5, la largeur de l'organe adamantin est réduite au niveau de l'incisive Tabby par rapport aux incisives WT [Miard et coll., 1999]. De plus des analyses morphométriques de l'organe de l'émail des incisives Wild-type et Tabby montrent une réduction de plus en plus marquée du diamètre des incisives Tabby au cours du développement [Miard et coll., 1999].

Le stade de capuchon dentaire est caractérisé chez les WT par le développement de la lèvre cervicale, de l'EK1 et par l'histogénèse de l'organe adamantin. A ED15.5 de développement, une histogénèse limitée de l'organe de l'émail, est observée chez les embryons Tabby [Pispa et coll., 1999]. Le développement de la lèvre cervicale est retardé chez les embryons Tabby à ED 14,5 de développement et une perte de l'asymétrie labio-linguale du centre de croissance postérieur de la lèvre cervicale est également associée à la mutation Tabby [Miard et coll., 1999]. De plus, à ED 18, l'incisive Tabby présente une rotation latérale [Lesot et coll., 2004]. A la naissance, les incisives des souris Tabby présentent des différences au niveau de la taille et de la morphologie avec une papille dentaire réduite [Miard et coll., 1999]. La cytodifférenciation odontoblastique est retardée de 24h chez la souris Ta, suggérant des modifications de la cinétique de différenciation cellulaire [Miard et coll., 1999]. Des observations histologiques et reconstructions tri-dimensionnelles ont également montré une réduction de la lèvre cervicale et une anomalie de l'organe de l'émail chez les souris Tabby post-embryonnaires (Lesot et coll., 2004).

Le phénotype incisif des souris Tabby adultes est caractérisé par des agénésies, hypoplasies ou fusions d'incisives, dont la prévalence varie entre 11% et 85% selon le fond génétique considéré [Grüneberg, 1971]. Dans une autre étude phénotypique, une absence uni-latérale d'incisive mandibulaire Tabby est observée dans 15% des cas et une absence bi-latérale dans 3% des cas, malgré un développement anténatal bilatéral systématique des incisives mandibulaires Tabby [Lesot et coll., 2004]. De plus, une réduction de la surface d'ancrage radiculaire a été observée chez la souris Tabby à 10 PND [Lesot et coll., 2004].



A



B

**Fig 16 :** (A) Analyses par micro-tomographie de mandibules de souris WT (A-C) et Ta (D-H) montrant une absence d'incisive chez Ta et une hypoplasie de l'os mandibulaire (H). (B) Coupes sagittales en micro-tomographie montrant une mandibule WT (A), une hémimandibule Ta avec une incisive hypoplasique (B) et une hémimandibule Ta avec une agénésie d'incisive (C).

---

## **2. PHENOTYPE OSSEUX ASSOCIE A LA MUTATION TABBY**

---

A côté des manifestations phénotypiques concernant les dérivés ectodermiques [Peterkova et coll., 2002 ; Kristenova et coll., 2002], la mutation Tabby est également associée à des dysmorphies squelettiques et des modifications structurales osseuses [Hill et coll., 2002]. Ces atteintes osseuses liées à la mutation *Ta* soulignent les fonctions moléculaires de la voie EDA-NF- $\kappa$ B dans l'ostéogenèse. Un phénotype caudal spécifique a été décrit chez la souris Tabby avec des anomalies anatomiques sous forme d'une angulation caudale [Falconer 1952 ; Grüneberg, 1966]. Cette description phénotypique a fait l'objet d'une recherche des mécanismes étiopathogéniques à l'origine de cette dysmorphie, et notamment d'une analyse de la structure squelettique vertébrale de la souris Tabby.

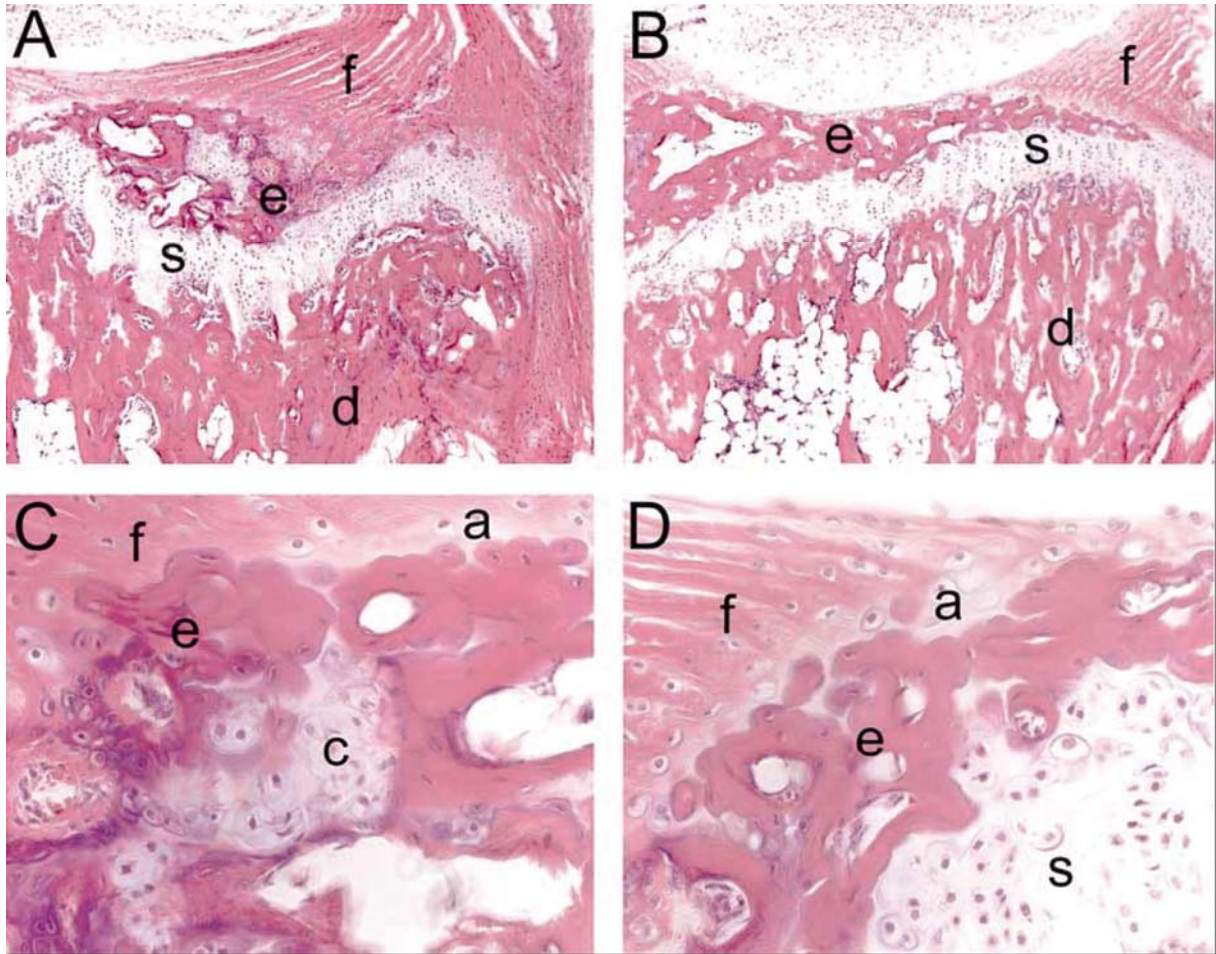
L'approche analytique au niveau des vertèbres Tabby a montré des anomalies osseuses histologiques avec des zones épiphysaires, sub-épiphysaires et diaphysaires peu différenciées et démarquées [Hill et coll., 2002]. De plus, des inclusions cellulaires du cartilage sub-épiphysaire sont retrouvées au niveau de l'épiphyse, ainsi qu'une interface irrégulière entre épiphyse et fibres ligamentaires [Hill et coll., 2002]. Une dysmorphie de la zone sub-épiphysaire est observée à proximité du disque intervertébral, avec une dysplasie épiphysaire et des inclusions intra-osseuses de cartilage [Hill et coll., 2002].

Les analyses histologiques ont été complétées par une analyse par micro-tomographie ( $\mu$ -CT) permettant une approche expérimentale des modifications de la densité et de la structure osseuse associées à la mutation Tabby. L'analyse par  $\mu$ -CT montre une augmentation de la densité osseuse trabéculaire au niveau du tibia de la souris Tabby. Les paramètres osseux trabéculaires statistiquement augmentés chez la souris Tabby correspondent au volume osseux trabéculaire, aux nombres de connexions inter-trabéculaire et de trabéculations osseuses [Hill et coll., 2002]. De plus, une réduction significative de l'espacement inter-trabéculaire a également été détectée par  $\mu$ -CT chez la souris Tabby et correspond à l'augmentation de l'ostéodensité associée à la mutation Tabby. Les anomalies anatomiques caudales de la souris Tabby semblent donc être en rapport avec des altérations structurales et cellulaires osseuses menant à des fractures vertébrales spontanées.

Des analyses par micro-tomographie de mandibules de souris Tabby à 25 PND ont montré une hypotrophie osseuse mandibulaire (Fig 16) avec une forte réduction de l'alvéole en rapport avec l'agénésie uni-latérale d'incisive mandibulaire [Lesot et coll., 2004].

Des dysmorphies squelettiques crânio-faciales sont associées au modèle murin Tabby et ont été décrites précocément dans le cadre des analyses phénotypiques initiales du modèle Tabby [Grüneberg et coll., 1971].

De façon intéressante, le modèle murin de dysplasie ectodermique autosomique, la souris Downless, caractérisée sur le plan moléculaire par une mutation du gène *EDAR*, ne présente pas le même phénotype caudal avec angulation de la queue et fractures vertébrales spontanées [Sofaer, 1969]. L'isoforme EDA-A2, issue du splicing alternatif de l'EDA-A, et se liant au récepteur XEDAR pourrait donc également être impliquée dans le phénotype osseux de la souris Tabby. Les fonctions moléculaires de la voie de transduction EDA-A2-XEDAR doivent donc être étudiées, et notamment au niveau de l'ostéoclastogenèse et l'ostéogenèse.



**Fig 17** : Analyses histologiques de la structure squelettique vertébrale de la souris Tabby (A et C) comparée à la souris Wildt-type (B et D) : Dysmorphie sub-épiphysaire (région s), dysplasie épiphysaire (région e) et inclusions cartilagineuses (c). Selon Hill et coll. (2002).

## PROBLEMATIQUE, OBJECTIFS ET STRATEGIE

---

### 1. HYPOTHESES DE TRAVAIL

---

Pour le complexe EDA-A1-EDAR, les mutations du domaine d'homologie TNF, du site collagénique, du site de clivage protéolytique et du domaine transmembranaire de l'EDA ou des sites LBD et DD de EDAR auraient des effets fonctionnels et phénotypiques différents. Les formes autosomiques dominantes et récessives de DEH, liées à des mutations des gènes *EDAR-EDARADD*, seraient distinctes sur le plan phénotypique de la DEX.

Des corrélations entre le génotype et le phénotype général [Vincent et coll., 2001] n'ont pas été établies dans la DEX. Des analyses phénotypiques dentaires fines de la distribution topographique des agénésies et du type de dents atteint en fonction du génotype n'ont pas été réalisées. Des corrélations génotype-phénotype dentaire et un rôle diagnostique de l'expression dentaire pourraient être identifiables.

L'oligodontie sévère des patients atteints de DEX requiert une réhabilitation implanto-prothétique [Bergendal et coll. 1991 ; Sweeney et coll., 2005 ; Guckes et coll., 2002].

Des taux de complication de l'ostéointégration implantaire plus élevés chez les enfants atteints de DEX que chez les enfants atteints d'oligodontie non-syndromique ont été rapportés [Bergendal et coll., 2008]. En effet, 64,3% d'échec implantaire durant la phase d'ostéointégration ont été décrits au niveau de la mandibule, ce qui constitue un taux d'échec particulièrement élevé [Bergendal et coll., 2008]. Chez l'adulte atteint de DEX, des taux d'échec implantaire inférieurs de 9%, ont été décrits au niveau de la mandibule, avec néanmoins une forte augmentation de ces taux (24%) concernant les implants maxillaires [Guckes et coll., 2002]. Dans cette étude, 27% des patients DEX était caractérisés par au moins une complication de l'ostéointégration implantaire [Guckes et coll., 2002].

Différents facteurs étiologiques peuvent être incriminés dans ces complications implantaires, notamment les facteurs anatomiques, avec l'hypotrophie osseuse et la croissance osseuse, en ce qui concerne les thérapeutiques implantaires précoces. Une diminution des fonctions cellulaires ostéoblastiques et de la vascularisation au niveau des tissus osseux des patients DEX, mécanismes essentiels dans l'ostéointégration, peut également être suggérée.



Des modifications structurales et métaboliques osseuses, liées aux altérations de la voie EDA-NF- $\kappa$ B, pourraient interférer avec les processus d'ostéointégration. Une compréhension des facteurs intervenant dans les complications implantaire nécessite une analyse du phénotype osseux, basée sur des examens scanographiques chez l'homme. Ces modifications structurales osseuses seraient identifiables sur des examens scanographiques crânio-faciaux de patients DEX et quantifiables par des profils densitométriques ou une analyse de la densité osseuse selon la classification de Lekholm et Zarb [Lekholm, 1986].

Les examens d'imagerie chez l'homme, seront complétés par des analyses du phénotype osseux mandibulaire chez la souris Tabby, modèle expérimental de la DEX. Ce modèle a permis de suggérer des anomalies squelettiques au niveau des os longs et des vertèbres, sous forme d'augmentation de la densité trabéculaire [Hill et coll., 2002]. De telles anomalies n'ont pas été recherchées au niveau de la mandibule.

---

## **2. OBJECTIFS EXPERIMENTAUX**

---

Nos principaux objectifs visent à :

**1)** Analyser le phénotype dentaire et sa sévérité dans la DEX et les DEH autosomiques chez l'homme.

Concernant le phénotype dentaire du modèle Tabby, la variabilité phénotypique dentaire, par phénotypage incisif de souris Tabby post-embryonnaires et adultes, sera analysée dans le prolongement des travaux de Miard et coll., 1999 (phénotypage incisif prénatal des souris Tabby avec mise en évidence d'une hypotrophie et d'anomalies morphologiques de l'organe de l'émail et de la papille dentaire), en se basant sur des analyses histomorphométriques des incisives mandibulaires à des stades de développement post-natal précoce (0,5 et 5 PND).

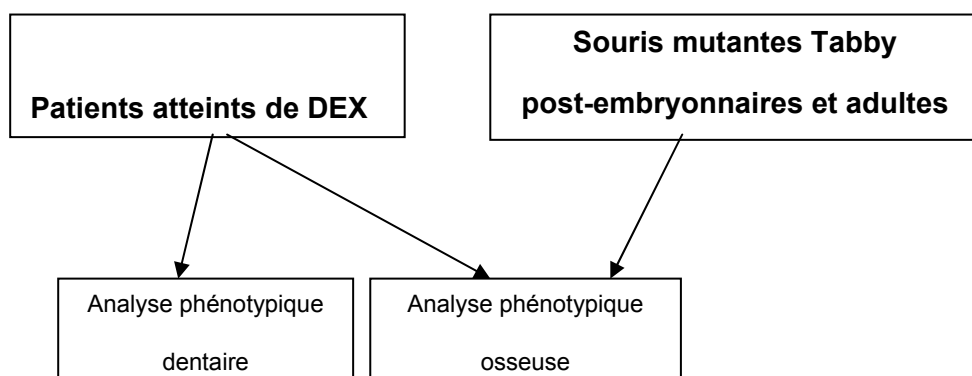
**2)** Rechercher l'existence de corrélations génotype-phénotype dentaire de la DEX et des DEH autosomiques. L'analyse du phénotype dentaire en fonction du gène muté (*EDA-EDAR*), du type de mutations du gène *EDA* (mutations tronquantes ou non-tronquantes) et en fonction du domaine fonctionnel de l'*EDA-A1* muté (site TNF, site de clivage protéolytique, site collagène-like ou intra-cytoplasmique-transmembranaire de l'*EDA-A1*) sera également réalisée.

**3)** Caractériser les manifestations phénotypiques osseuses dans la DEH chez l'homme et le modèle expérimental murin Tabby. Les approches seront basées chez l'homme sur l'analyse d'examens scanographiques, et chez la souris Tabby, sur des analyses histologiques et histomorphométriques osseuses.

---

### **3. STRATEGIES**

---



## **CHAPITRE II**

### **RESULTATS**



# **GENOTYPES, PHENOTYPES DENTAIRES ET OSSEUX DANS LA DYSPLASIE ECTODERMIQUE HYPOHIDROTIQUE**

Dans le cadre de cette revue, nous avons posé un certain nombre de questions qui seront abordées dans la suite de ce mémoire.

---

## **1. PUBLICATION A « DENTO-CRANIO-FACIAL PHENOTYPES AND UNDERLYING MOLECULAR MECHANISMS IN HYPOHIDROTIC ECTODERMAL DYSPLASIA (HED) : A REVIEW »**

---

### ***Journal of Dental Research, sous presse***

Cet article aborde les manifestations phénotypiques dentaires et crânio-faciales décrites dans la littérature, ainsi que les aspects moléculaires de la dysplasie ectodermique hypohidrotique liée à l'X (DEX) et des formes autosomiques de DEH.

Nous rapportons également des observations préliminaires, suggérant un phénotype osseux associé à la DEX, et tentons de l'expliquer par les fonctions biologiques de la voie de signalisation Ectodysplasine (EDA)-NF-κB.

Les DEH constituent un groupe complexe de syndromes malformatifs, impliquant l'ensemble des modes de transmission mendélienne et défini par un développement et une morphogenèse pathologiques des dérivés ectodermiques [Pinheiro et Freire-Maia., 1994].

Les DEH sont causées par des mutations de gènes codant pour l'ensemble du complexe moléculaire EDA- Ectodysplasin Receptor (EDAR) –NEMO-NF-KB.

A côté de la mutation du gène *EDA*, responsable de la DEX, les mutations du gène *EDAR* et du Death-Domain intracellulaire Ectodysplasin Receptor Associated Death-Domain (*EDARADD*) sont impliquées dans les formes autosomiques dominantes et récessives de DEH [Bal et coll., 2007, Van der Hout et coll., 2008]. Des mutations du gène *NEMO* sont identifiées dans les formes complexes de DEH avec immunodéficiência et ostéopétrose.

Le récepteur EDAR active les facteurs intracellulaires TNF-Receptor Associated Factor 6 (TRAF6)-TAK1 Binding Protein-2 (TAB2) et TGF $\beta$  Activating Kinase-1 (TAK1) menant à l'activation du complexe de kinases Inhibitor Kappa Kinase  $\alpha/\beta$  (IKK $\alpha$ /IKK $\beta$ ) associées au modulateur IKK $\gamma$ /NEMO [Morlon et coll., 2005]. Le complexe dimérique NF- $\kappa$ B a différentes cibles transcriptionnelles impliquées dans les mécanismes de morphogenèse (Shh), d'homéostasie cellulaire (Cyclin-D1) et la différenciation ostéoclastique (Nuclear Factors Activated T-cells 1/2 : NFAT1/2) [Laurikkala et coll., 2001]. La voie de signalisation EDA-NF- $\kappa$ B est en interaction avec les voies BMP/Msx, FGF, Wnt/ $\beta$ -caténine et Activine [Pummila et coll., 2007].

### **Phénotype dentaire**

Un phénotype d'oligodontie, le plus souvent sévère, est également associé à la DEX en denture temporaire et permanente [Prager et coll., 2006], des microdonties, des dents antérieures conoïdes ou un taurodontisme font également partie du tableau clinique.

Les femmes vectrices de la mutation *EDA* présentent un phénotype d'hypodontie ou d'oligodontie modérée et des anomalies morphologiques coronaires pouvant constituer autant de marqueurs phénotypiques de la mutation *EDA* à l'état hétérozygote.

### **Mécanismes moléculaires à la base des anomalies de l'odontogenèse**

La voie EDA-NF- $\kappa$ B est en interaction étroite avec la voie BMP-Msx, essentielle dans la différenciation des cellules odontogènes des crêtes neurales, via les facteurs inhibiteurs Ccn2/Ctgf (Cyr61 CTGF Nov Family Protein-2/Connective Tissue Growth Factor) et Follistatine qui sont des cibles transcriptionnels de NF- $\kappa$ B [Pummila et coll., 2007]. Ces mécanismes peuvent être altérés par la mutation *EDA*, entraînant une inhibition de la formation des placodes ectodermiques. L'odontogenèse fait également appel à des interactions entre EDA-NF- $\kappa$ B et FGF, régulant le niveau d'expression mésenchymateux de *Msx-1* [Bushdid et coll., 2001], pouvant être perturbés par la mutation *EDA*.

### **Phénotype crânio-facial associé à la DEX**

La dysmorphie crânio-faciale est caractérisée par une hypoplasie maxillaire, un prognathisme mandibulaire, une concavité faciale, une proéminence frontale et des anomalies de la base du crâne [Johnson et coll., 2002]. Les analyses céphalométriques réalisés sur nos patients DEX ont révélé des réductions des hauteurs faciales, une hypoplasie de la partie antérieure de la base du crâne (Selle turcique-Nasion : S-Na) et une augmentation de la dimension sagittale de la partie postérieure de la base du crâne (Basion-

Selle turcique : Ba-S). Nous avons également identifié une augmentation de l'angle de flexion basicrânien.

### **Mécanismes moléculaires impliqués dans les anomalies crânio-faciales**

Les dysfonctions moléculaires de la voie de signalisation EDA-NF-KB peuvent être à l'origine de troubles de la morphogenèse crânio-faciale via les interactions entre EDA et de nombreux facteurs impliqués dans la différenciation des crêtes neurales céphaliques ostéogéniques.

L'expression d'EDA a été localisée au niveau des cellules neuroectodermiques et des ostéoblastes de la voûte crânienne [Montonen et coll., 1998], suggérant une fonction précoce d'EDA dans l'ostéogenèse crânio-faciale et des effets de la mutation *EDA* sur cette dernière. L'activité FGF joue également un rôle prépondérant dans le patterning squelettique crânio-facial et la mutation *EDA* peut interférer avec ces processus de par le contrôle par NF-κB de la régulation de *Msx1* FGF-dépendante. En effet, FGF intervient dans l'expression du potentiel de différenciation ostéogénique et chondrogénique des cellules des crêtes neurales via les gènes homéotiques *Barx-1*, *Dlx-1* et *Msx-1* [Sasaki et coll., 2006]. De plus, La voie BMP-*Msx* est également impliquée dans la différenciation précoce des cellules des crêtes neurales ostéogènes et est influencée par la mutation *EDA*. de par les interactions entre les voies de signalisation EDA et BMP-*Msx* [Pummila et coll., 2007].

### **Modifications phénotypiques osseuses maxillaires et mandibulaires et mécanismes moléculaires**

Les examens scanographiques mandibulaires de 3 patients mâles DEX montrent la présence de zones d'hyperminéralisation médullaire variable au niveau de la symphyse mandibulaire associées à une hyper-corticalisation. Des modifications osseuses similaires ont été retrouvées chez le modèle murin Tabby de DEX par micro-tomographie (micro-CT), avec une augmentation du volume et de la densité osseuse trabéculaire tibiale [Hill et coll., 2002).

L'EDA est exprimé au niveau des ostéoblastes du crâne et des côtes en phase de sécrétion matricielle dès la 12<sup>ème</sup> semaine de développement embryonnaire humain, suggérant un rôle de l'EDA dans l'ostéogenèse, notamment crânio-faciale [Montonen et coll., 1998]. Des anomalies métaboliques osseuses ont été retrouvées dans la DEX avec une réduction des taux d'hormone parathyroïdienne (PTH), qui est un régulateur de la différenciation ostéoclastique, via la cytokine ostéoclastogénique Receptor Activator of NF-KB Ligand (RANKL). Ces anomalies pourraient être à l'origine de troubles du remodelage osseux.

Il existe des interactions fonctionnelles entre la voie RANKL- Receptor Activator of NF-KB (RANK)-TRAF6-NF-KB et EDA-NF-KB, utilisant les mêmes facteurs d'adaptation intracellulaire TRAF6-TAB2-TAK1. Celles-ci pourraient être perturbées par la mutation *EDA* à l'origine d'anomalies du remodelage osseux.

### **Thérapeutiques implantaires**

La thérapeutique bucco-dentaire des patients atteints comporte la es implants ostéointégrés, ce qui justifie une analyse précise du phénotype osseux et des processus d'ostéointégration. Des taux de survie implantaire de 95% ont été rapportés chez des patients DEX, avec néanmoins 27% de patients présentant au moins une complication de l'ostéointégration ; les complications pourraient être liées à l'hypotrophie osseuse ou aux modifications structurales.

### **Perspectives thérapeutiques**

L'administration anténatale d'EDA a mené à une réversion du phénotype de souris Tabby au niveau des anomalies morphologiques dentaires et des phanères [Gaide and Schneider, 2003]. La transgénèse d'EDA-A1 chez les souris Tabby a mené à une restauration du phénotype wild-type montrant l'intérêt de ces approches thérapeutiques expérimentales.

### **Conclusions**

- Les données de la littérature relevées dans cet article montrent qu'une oligodontie de sévérité variable et des dysmorphies coronaires sont associées à la DEX et aux DEH autosomiques. Ces observations posent la question de corrélations éventuelles entre le génotype et le phénotype dentaire. Les mécanismes moléculaires invoqués correspondent à une altération des fonctions morphogénétiques de la voie EDA-EDAR-NF-κB dans l'odontogenèse.
- Dans la mesure où certains patients DEX présentent des modifications structurales osseuses mandibulaires (hyperminéralisation médullaire et hypercorticalisation) il sera nécessaire de réaliser des analyses phénotypiques osseuses approfondies.



---

## 2. PROTOCOLE DE RECHERCHE CLINIQUE

---

La partie de recherche clinique développée dans ce mémoire consiste en une étude prospective multicentrique constituant le volet bucco-dentaire du PHRC intitulé « **Voie NF- $\kappa$ B-homéostasie épidermique : caractérisation génétique et biochimie du spectre clinique allant de l'Incontinentia Pigmenti aux Dysplasies Ectodermiques : un modèle d'étude pour des pathologies épidermiques cliniquement proches** ». Le médecin investigateur principal du PHRC est le Pr Christine BODEMER, Chef du Service de Dermatologie et coordonateur du Centre de référence pour les génodermatoses, Hôpital Necker-Enfants Malades (AP-HP, Paris). Ce PHRC a pour objectifs principaux le phénotypage général et la recherche de corrélations génotype-phénotype dans les dysplasies ectodermiques hypohidrotiques.

Sur le plan bucco-dentaire et maxillo-facial, deux études complémentaires ont été menées :

- Phénotype dentaire et corrélations génotype-phénotype dentaire.
- Phénotype osseux.

### 2.1 MATERIELS

#### 2.1.1 Critères d'éligibilité

- Age  $\geq$  2 ans pour l'examen clinique bucco-dentaire, les moulages et les photographies.
- Age  $\geq$  6 ans pour l'examen radiographique panoramique.
- Examen tomodensitométrique pratiqué uniquement chez les patients chez qui un bilan pré-implantaire est indiqué dans le cadre de la prise en charge thérapeutique.
- Affiliation à un régime de sécurité sociale.
- Consentement éclairé signé par les parents et par l'enfant lorsque l'âge le permet.

- Diagnostic clinique de DEX ou de DEH autosomique confirmé.

Le phénotype clinique est établi lors d'une consultation de génétique médicale ou de dermatologie sur la base de critères diagnostiques majeurs et mineurs :

<i>Critères cliniques majeurs</i>	Oligodontie Hypotrichose Hypofonctionnement sudoral Onychodysplasie Dysmorphie crânio-faciale Hyperpigmentation péri-orbitaire
<i>Critères cliniques mineurs</i>	Xérophtalmie Xérostomie Asthme Atteinte oculaire Diabète type I Terrain atopique Dystrophie cutanée Pathologie inflammatoire digestive / broncho-pulmonaire

- Diagnostic moléculaire connu ou en cours de détermination.

Le diagnostic moléculaire consiste en un séquençage de première intention des 8 exons du gène *ED1* codant pour l'isoforme EDA-A1. L'ADN génomique est extrait des leucocytes périphériques selon des protocoles standards. Les 8 exons du gène *ED1*, ainsi que les jonctions exons-introns ont été amplifiées par PCR en utilisant des primers précédemment publiés [Kere et coll., 1996 ; Bayès et coll., 1998]. Les fragments de PCR ont été purifiés avec le kit QIAquick Gel Extraction (Qiagen SA France; [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com)) et séquencés en utilisant un kit de séquençage BigDye DNA (Applied Biosystems, UK; [www.appliedbiosystems.com](http://www.appliedbiosystems.com)). Les réactions ont été analysées avec le séquenceur ABI100 (Applied Biosystems, UK). Lorsque la mutation étiologique n'est pas détectée sur le gène *ED1*, les autres loci amplifiés et séquencés correspondent aux gènes *EDAR* et *EDARADD* mutés dans les formes autosomiques dominantes et récessives en utilisant les primers précédemment publiés [Monreal et al, 1999, Bal et al, 2007].

Lorsque la mutation n'a pas été identifiée sur les gènes *ED1*, *EDAR* et *EDARADD*, le diagnostic moléculaire se porte sur les gènes codant pour les molécules adaptatrices de la voie EDA-NF- $\kappa$ B, TAB2 (TAK1 Binding Protein-2), TRAF6 (TNF Receptor Associated Factor 6) et TAK1 (TGF- $\beta$  Activated Kinase-1). Ces molécules adaptatrices sont de nouveaux gènes candidats pour les DEH non-ED1.

Ce diagnostic moléculaire est effectué soit au Service de Génétique Médicale, Hôpital Purpan, Toulouse (Dr M-C Vincent et Dr N Chassaing) soit à l'unité INSERM U781 (Génétique et Epigénétique des maladies métaboliques neuro-sensorielles et du développement) et service de Génétique, Hôpital Necker-Enfants Malades, AP-HP, Paris (Dr G Courtois et Dr A Smahi).

### **2.1.2 Inclusion des patients**

L'inclusion a débuté en juin 2006 et se poursuit encore actuellement.

Elle est réalisée dans deux centres de références, celui des manifestations odontologiques des maladies rares des Hôpitaux Universitaires de Strasbourg et le Centre de référence pour les génodermatoses de l'hôpital Necker-Enfants-Malades (MAGEC), ainsi que par l'intermédiaire du service de génétique médicale du CHU de Toulouse.

Le centre de référence pour les malformations rares de la face et de la cavité buccale (Paris Garancière) et deux centres de compétence (Marseille et Bordeaux) ont également permis le recrutement de plusieurs patients. Les examens cliniques ont été effectués sur place et tous les documents photographiques et radiologiques nous ont été transmis.

L'Association Française des Dysplasies Ectodermiques (AFDE) collabore à ce projet de recherche en informant les familles afin d'optimiser le recrutement des patients.

## **2.2 METHODES**

### **2.2.1 Examens cliniques et radiologiques**

- Examen clinique bucco-dentaire.
- Photographies intra-buccales.
- Empreintes pour modèle d'étude des arcades dento-alvéolaires.
- Radiographie panoramique dentaire (orthopantomogramme) effectuée près du domicile du patient pour les enfants âgés de 6 ans et plus ou dans les centres de référence. Dans certains cas, des familles sont venues en consultation au Centre de Référence de Strasbourg ou de Necker avec des examens radiographiques déjà effectués par le praticien traitant, parfois alors que l'enfant est âgé de moins de six ans. Ceux-ci ont été intégrés dans l'analyse phénotypique dentaire. Cet examen n'a

pas été reproduit sans indications spécifiques afin de respecter les mesures de radioprotection pédiatrique.

- Les téléradiographies intra-buccales sont réalisées uniquement chez les patients en cours de soins à Strasbourg.
- L'examen tomodensitométrique concerne seulement les patients qui nécessitent un bilan pré-implantaire.

Les données cliniques concernant les anomalies des dents temporaires et permanentes, les tissus mous ainsi que les données radiologiques sont saisies dans la base de données *D4Phenodent* ([www.Phenodent.org](http://www.Phenodent.org)).

## 2.2.2 Analyses phénotypiques

### A) Phénotype dentaire

#### Critères diagnostiques des agénésies dentaires

Les orthopantomogrammes ont fait l'objet d'un double examen par 2 investigateurs, afin d'évaluer la reproductibilité inter-examineur des observations.

Pour chaque patient, le nombre d'agénésies dentaires en denture temporaire et permanente, ainsi que leur distribution topographique au maxillaire et à la mandibule ont été déterminés. L'identification des dents présentes est basée sur des critères de localisation anatomique et de morphologie coronaire et radiculaire. Lorsque l'étiologie de l'absence de dents était indéterminée (traumatisme, avulsion...), les données phénotypiques n'ont pas été intégrées à l'analyse. Les agénésies dentaires des troisièmes molaires n'ont pas été prises en compte. La sévérité de l'hypodontie ou de l'oligodontie est évaluée selon les critères suivants :

#### En denture temporaire :

- 0 - 6 agénésies : phénotype modéré d'hypodontie
- 6 - 12 agénésies : phénotype intermédiaire d'oligodontie
- 12 - 20 agénésies : phénotype sévère d'oligodontie.

#### En denture permanente :

- 0 - 6 agénésies : phénotype modéré d'hypodontie
- 6 - 12 agénésies : phénotype intermédiaire d'oligodontie
- 12 - 22 agénésies : phénotype sévère
- 22 - 28 agénésies : phénotype très sévère

Elle est complétée par l'étude du type de dents concerné par les agénésies.

### Critères diagnostiques des anomalies morphologiques

La morphologie coronaire des incisives et des molaires des patients a été évaluée à partir des examens cliniques, des photographiques intra-buccales et des examens radiographiques. Une incisive temporaire ou permanente est considérée comme dysmorphique lorsqu'elle présente une morphologie conique, conoïde ou une réduction du diamètre mésio-distal du bord incisif. Une molaire temporaire ou permanente est considérée comme dysmorphique lorsqu'elle présente une réduction du nombre de cuspides, ainsi qu'une morphologie ou une organisation cuspidienne anormale. Les canines et les prémolaires n'ont pas été étudiées car l'évaluation des anomalies morphologiques est plus aléatoire.

### Corrélations génotype-phénotype dentaire

Le nombre et la distribution topographique des agénésies dentaires en denture temporaire et permanente ont été corrélés aux statuts moléculaires des patients atteints de DEX ou de DEH autosomique, c'est à dire :

- aux gènes mutés (*ED1* ou *EDAR*)
- aux types de mutations du gène *ED1* (mutations tronquantes ou non-tronquantes). Les mutations non-tronquantes du gène *ED1* sont les mutations faux-sens et les délétions dans le cadre de lecture (« inframe deletion »).
- Les mutations tronquantes du gène *ED1* sont les mutations « frameshift », les mutations non-sens et les larges délétions géniques.
- aux domaines moléculaires de l'EDA-A1 affectés par la mutation : mutations faux-sens touchant le domaine d'homologie TNF (exon 6-8 du gène *ED1* selon la séquence référence NM\_001399) ou le site de clivage protéolytique furine-dépendant (exon 2 selon la séquence référence NM\_001399).

### Analyses statistiques

Les comparaisons du nombre d'agénésies dentaires total, maxillaire et mandibulaire en denture temporaire et permanente ont été effectuées entre les groupes de mutations *EDA*, *EDAR*, TNF et furine par des tests non paramétriques de Kruskal-Wallis. Les comparaisons entre ces mêmes groupes de mutations, du type de dents touché par les agénésies en denture temporaire et permanente ont été réalisées par des tests non-paramétriques de Kruskal-Wallis. Les comparaisons de pair du nombre d'agénésies maxillaire et mandibulaire, pour chaque groupe de mutation, ont été réalisées par des tests non paramétriques de Wilcoxon.

## B) Phénotype osseux

Un examen tomодensitométrique de la mandibule a été réalisé pour les patients DEH et le groupe contrôle, selon un protocole d'imagerie équivalent.

Les examens scanographiques des patients contrôles ont été effectués dans le cadre d'une indication implantaire associée à une oligodontie non syndromique, un édentement acquis ou un bilan d'une pathologie maxillo-faciale mais sans répercussions sur la région symphysaire mandibulaire.

### Analyses qualitatives

La détermination des densités osseuses médullaire et corticale a été effectuée au niveau de la région symphysaire mandibulaire à partir des examens scanographiques en se basant sur la classification des densités osseuses de Lekholm et Zarb. Cette classification de Lekholm et Zarb identifie 4 types de densité osseuse de D1 (type hyperdense) à D4 (faible densité) (Fig 18) [Lekholm, 1986; De Oliveira et coll., 2008]. Elle a été utilisée pour notre étude car une corrélation a été montrée entre la classification de Lekholm et Zarb et la densité minérale osseuse (BMD) évaluée par tomographie quantitative à faisceau conique [Aranyarachkul et coll., 2005].

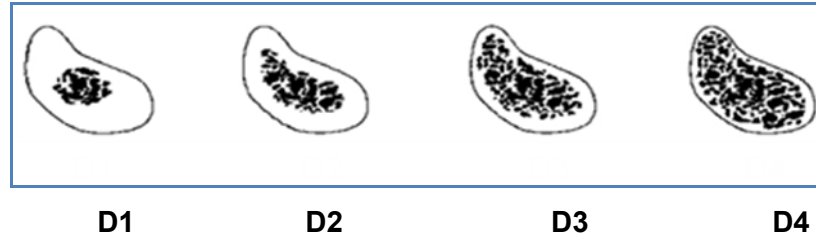


Fig 18 : Classification des densités osseuses selon Lekholm et Zarb.

- La densité osseuse de type D1 est définie par un os constitué intégralement d'os cortical homogène fortement minéralisé.
- La densité osseuse D2 est caractérisée par une épaisse couche corticale entourant une zone médullaire centrale d'os trabéculaire.
- La densité osseuse D3 est caractérisée par une fine couche corticale entourant une zone centrale d'os médullaire.
- La densité D4 se définit par la présence d'une fine couche corticale entourant une zone d'os trabéculaire de faible densité. [Lekholm, 1986].

Les profils densitométriques osseux de la région symphysaire mandibulaire ont été comparés à des profils densitométriques témoins. Les coupes scanographiques de la

mandibule ont fait l'objet d'une analyse sur un logiciel de simulation implantaire permettant la réalisation d'un profil densitométrique (logiciel *Simplant*<sup>TM</sup>, Columbia Scientific, Inc, Columbia, USA).

#### Analyses quantitatives

Mesures de l'épaisseur de la corticale mandibulaire sur les coupes scanographiques transversales et sagittales à l'aide du logiciel de simulation implantaire *Simplant*. Les mesures d'épaisseur corticale ont été comparées à des mesures contrôles.

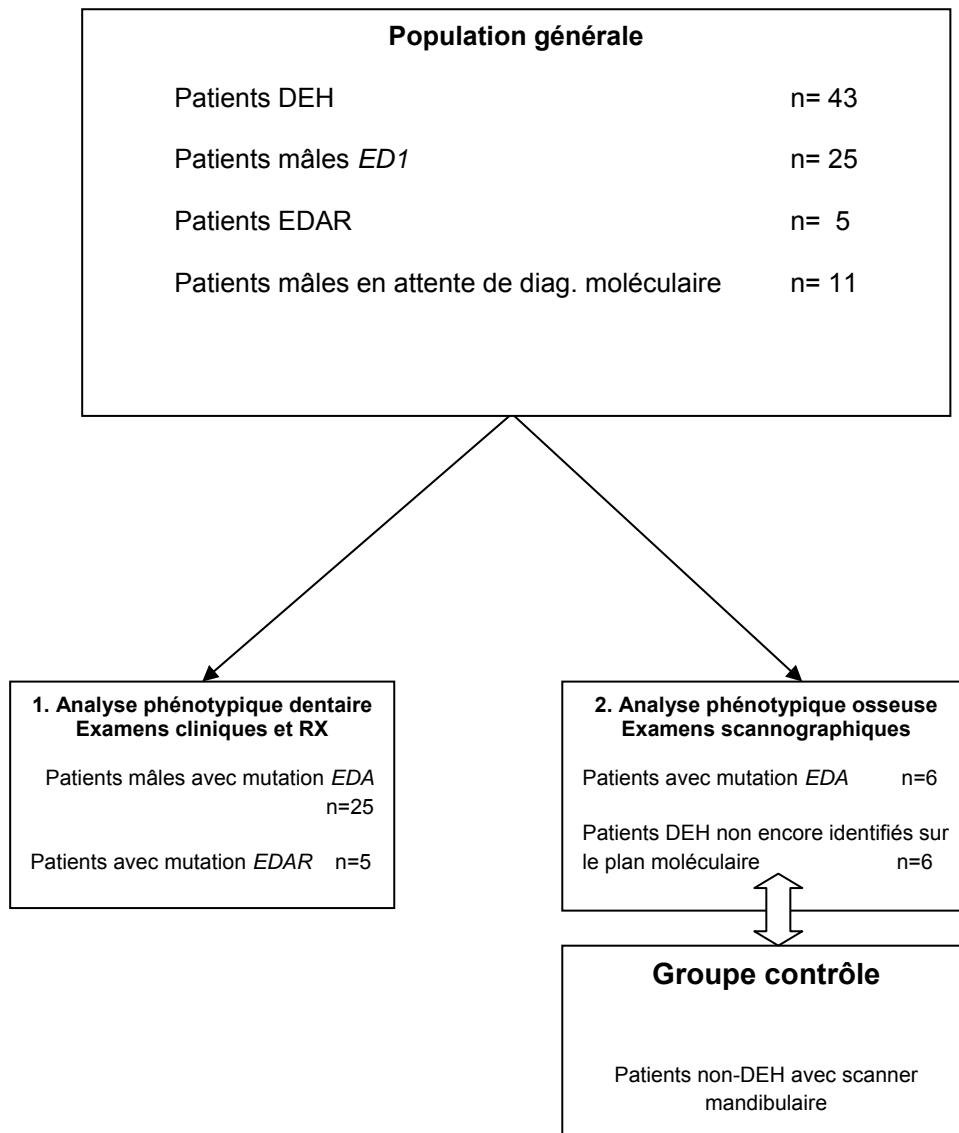
#### Analyse des anomalies morphologiques et structurales osseuses sur des reconstructions tridimensionnelles mandibulaires

Réalisation de reconstructions multiplanaires tridimensionnelles de la mandibule à partir des examens scanographiques à l'aide du logiciel *Simplant*. Des reconstructions en isosurface ont été également réalisées à partir des images natives des examens scanographiques à l'aide du logiciel *Amira* (version 2.3, TGS, Chelmsford, Massachusetts, USA) permettant une analyse morphologique et une étude de la structure trabéculaire au niveau de l'espace inter-cortical mandibulaire.

#### Analyse des densités osseuses en Unités Hounsfields

Les densités osseuses corticales basales et alvéolaires maxillaires, ainsi que la densité corticale mandibulaire ont été évaluées en unités Hounsfields (HU), chez des patients DEH et comparées à des données contrôles issues de la littérature (Turkyilmaz et coll., 2007; Park et coll., 2008).

### 2.2.3 Plan expérimental



**Fig 19** : Population générale et distribution des patients DEX et DEH en fonction des analyses phénotypiques dentaire et osseuse.



## 2.3 POPULATION ETUDIEE

### 2.3.1 Provenance des patients

Centres	Avec diagnostic clinique et radiologique	Avec diagnostic clinique, radiologique, et moléculaire	Total	
CR Strasbourg + autres centres	11	12	23	
CR Necker	7	9	16	N= 39

**Tableau V** : Nombre de patients inclus en fonction des centres et des examens réalisés.

### 2.3.2 Génotypage des patients atteints de DEX et de DEH autosomique

Type de DEH	DEX	DEH autosomique	DEH non déterminée sur le plan moléculaire
Gènes mutés	Gène <i>EDA</i>	Gènes <i>EDAR</i> ou <i>EDARADD</i>	Complexe <i>EDA-EDAR</i> ou autres gènes de la voie de signalisation <i>EDA-NF-κB</i> ? ( <i>TAB2</i> , <i>TAK1</i> , <i>TRAF6</i> , <i>IKK...</i> )
N	19	7	13

**Tableau VI** : Nombre de patients en fonction des gènes mutés.

Les tableaux V et VI synthétisent les données moléculaires des patients ayant été inclus. 26 patients, appartenant à 23 familles différentes, présentent une mutation du gène *EDA* et 9 patients une mutation du gène *EDAR*, dans le cadre d'une DEH autosomique dominante ou récessive.

Concernant la forme liée à l'X, sur les 23 mutations pathogènes du gène *EDA*, 12 mutations, soit 52.1%, représentent des nouvelles variantes pathogènes :

- Une nouvelle mutation faux-sens c.466 C>G responsable de la modification protéique p.Arg.156Gly a été identifiée au niveau de l'exon 2 codant pour le site de clivage protéolytique de l'*EDA-A1*. Le résidu 156 est impliqué dans 2 séquences consensus *RVRR* et *RNKR* de reconnaissance de la protéase furine et correspond à un point chaud mutationnel.
- Trois nouvelles mutations faux-sens ont été identifiées au niveau de l'exon 6, codant pour le site d'homologie *TNF* de l'*EDA-A1*, et correspondent respectivement aux modifications nucléotidiques c.754 C>A, c.756T>G et c.871G>C.
- Deux nouvelles mutations faux-sens ont été observées au niveau des exons 7 et 8 du gène *EDA*, responsables respectivement des modifications protéiques c.820 T>C et c.1067 C>T.

- Une nouvelle mutation c.801 A>G d'un site donneur de splice de l'exon 7 du gène *EDA* a été observée.
- La large délétion génique, intéressant 6 exons (exons 3-8) constitue une nouvelle mutation tronquante du gène *EDA*.
- Les 2 mutations non-sens des exons 1 et 4 du gène *EDA* sont également des nouvelles mutations et correspondent respectivement aux modifications nucléotidiques c.149 C>A et c.694 C>T.
- Sur les 3 mutations frameshift du gène *EDA* identifiées, 2 représentent également des nouvelles variantes touchant les exons 4 et 7 du gène *EDA*, et sont responsables des modifications nucléotidiques c.579delT et c.884delT.

Une forte hétérogénéité génétique a donc été constatée dans notre groupe de patients DEX, les mutations étant distribuées sur les différents exons du gène *EDA*. Néanmoins, il y a un phénomène de « clustering » des mutations au niveau des exons codant pour les différents domaines fonctionnels moléculaires de l'isoforme EDA-A1, correspondant à l'exon 2 (site de clivage protéolytique furine-dépendant), aux exons 6-8 (site d'homologie TNF) ou au domaine collagène-like (exon 4).

- Les mutations faux-sens du gène *EDA* représentent la majorité des événements mutationnels, avec 60,8% des mutations.
- Les mutations par délétion dans le cadre de lecture du gène *EDA* ont été retrouvées chez 2 patients au niveau de l'exon 2 (délétion exonique complète) et de l'exon 8 (délétion de 9bp), représentant 8,6% des mutations.
- Une mutation d'un site donneur de splice de l'exon 7 a été identifiée chez un patient, correspondant à 4,3% des mutations.
- Les mutations non-sens sont retrouvées au niveau des exons 1 et 4 du gène *EDA* et correspondent également à 8,6% des mutations. Les mutations frameshift sont, quant à elle, retrouvées chez 3 familles au niveau des exons 4 (2 mutations) et 7 (1 mutation) correspondant à 13% des mutations.
- Une seule large délétion génique, intéressant les exons 3-8 de gène *EDA*, et représentant 4,3% des mutations a été observée.

Les mutations non-tronquantes, correspondant aux mutations faux-sens et aux délétions dans le cadre de lecture, représentent 69,5% des mutations, et les mutations tronquantes 31,5% des mutations.

L'exon 2 correspond à un point chaud de mutation avec 6/14 mutations faux-sens, représentant 42,8% des mutations. Le site de clivage protéolytique furine-dépendant est donc un domaine fonctionnel important sur le plan épidémiologique, dont la mutation est impliquée dans une forte proportion des DEX.

Les exons 6, 7 et 8, codant pour le site d'homologie TNF de l'EDA-A1, sont impliqués dans 57,1% des mutations faux-sens, le site TNF est donc l'autre domaine fonctionnel important de l'EDA-A1 sur le plan épidémiologique. En effet, les exons 6 et 7 représentent chacun 21,4% des mutations faux-sens, alors que l'exon 8 est atteint dans 14,2% des mutations faux-sens.

Le site collagène-like de l'EDA-A1 n'est impliqué dans aucune mutation faux-sens, mais il est concerné par 1 mutation non-sens (exon 4) et 2 mutations frame-shift (exon 4). Le domaine transmembranaire de l'EDA-A1 est muté dans le cadre d'une mutation non-sens de l'exon 1 du gène *EDA*, qui constitue une nouvelle mutation associée à un phénotype dentaire sévère.

Concernant la DEH autosomique :

- Des mutations du gène *EDAR* ont été identifiées chez six familles, avec des mutations faux-sens et splice touchant les exons 3, 4, 6 et 12. Sur ces 6 familles, 4 présentent une forme autosomique récessive et 2 présentent une forme autosomique dominante.
- Une seule nouvelle mutation du gène *EDAR* a été identifiée sur l'exon 12, correspondant à la modification nucléotidique c.1259 G>A. Les 2 familles présentant une forme autosomique dominante de DEH sont caractérisées par la même mutation c.1259 G>A de l'exon 12 du gène *EDAR*, responsable de la modification protéique p.R420G. Des formes autosomiques de DEH avec mutation du gène *EDARADD*, responsable de DEH autosomique aussi bien dominante que récessive, n'ont pas été identifiées dans notre étude.
- Deux familles avec DEH autosomique dominante sont hétérozygotes, l'une atteinte d'une mutation faux-sens de l'exon 3 et splice de l'exon 6 et l'autre d'une mutation faux-sens de l'exon 4 et splice de l'exon 6. Les autres familles sont homozygotes pour des mutations faux-sens de l'exon 12 du gène *EDAR*.

Patient	Age	Gène muté	Variation nucléotidique	Variation protéique	Exon muté	Type de mutation	Domaine fonctionnel	Mode de transmission
1	7	ED1	c.465 C>T	p.Arg155Cys	exon 2	Faux-sens	Site de clivage protéolytique furine	Lié à l'X
2	5	ED1	c.466 C>T	p.Arg156Cys	exon 2	Faux-sens	Site de clivage protéolytique furine	Lié à l'X
3		ED1	c.467 G>A	p.Arg156His	exon 2	Faux-sens	Site de clivage protéolytique furine	Lié à l'X
4	8	ED1	c.457 C>T	p.Arg153Cys	exon 2	Faux-sens	Site de clivage protéolytique furine	Lié à l'X
5	33	ED1	c.466 C>G	p.Arg156Gly	exon 2	Faux-sens	Site de clivage protéolytique furine	Lié à l'X
6		ED1	c.467 G>A	Arg156His	exon 2	Faux-sens	Site de clivage protéolytique furine	Lié à l'X
7		ED1	c.467 G>A	Arg156His	exon 2	Faux-sens	Site de clivage protéolytique furine	Lié à l'X
8	7	ED1	c.756 T>G	p.His252Gln	exon 6	Faux-sens	Domaine TNF	Lié à l'X
9	51	ED1	c.754 C>A	p.His252Asn	exon 6	Faux-sens	Domaine TNF	Lié à l'X
10	15	ED1	c.871G>A		exon 6	Faux-sens	Domaine TNF	Lié à l'X
11	4	ED1	c.896 G>A	p.Gly 299Asp	exon 7	Faux-sens	Domaine TNF	Lié à l'X
12		ED1	c.891 G>C	p.Asp298His	exon 7	Faux-sens	Domaine TNF	Lié à l'X
13		ED1	c.891 G>C	p.Asp298His	exon 7	Faux-sens	Domaine TNF	Lié à l'X
14	10	ED1	c.820 T>C	p.Trp274Arg	exon 7	Faux-sens	Domaine TNF	Lié à l'X
15	15	ED1	c.1048 G>T	p.Gly350Trp	exon 8	Faux-sens	Domaine TNF	Lié à l'X
16	3	ED1	c.1067C>T	p.Ala356Val	exon 8	Faux-sens	Domaine TNF	Lié à l'X
17	40	ED1	c.503 ?_526+ ?del	p.Gly168_Gly 176del	exon 2	Deletion In frame	Site de clivage protéolytique Furin	Lié à l'X
18	3	ED1	Mutation 9bp		exon 8	Deletion In frame	Domaine TNF	Lié à l'X
19		ED1	c.801 A>G	p.Ser267Ser	exon 7	Mutation site donneur de splice	Domaine TNF	Lié à l'X
20	9	ED1	c.503- ?_1176+ ? del	p.Gly168_Ser 391del	exons 3-8	Large Délétion	Domaine TNF	Lié à l'X
21	7	ED1	c.149 C>A	p.Ser50X	exon 1	Non-sens	Domaine trans membranaire	Lié à l'X
22		ED1	c.694 C>T	p.Gln232X	exon 4	Non-sens	Domaine Collagène	Lié à l'X
23	5	ED1	c.579delT	p.Pro193Profs 86X	exon 4	Mutation frameshift	Domaine Collagène	Lié à l'X
24	3	ED1	c.572-590del	p.Pro191Argfs 82X	exon 4	Mutation frameshift	Domaine Collagène	Lié à l'X
25	9	ED1	c.884delT	p.Val295Aspfs 12X	exon 7	Mutation frameshift	Domaine TNF	Lié à l'X
26		ED1	c.884delT	p.Val295Aspfs 12X	exon 7	Mutation frameshift	Domaine TNF	Lié à l'X

TNF : Tumor necrosis Factor . Nouvelles mutations pathogènes *EDA* grisées

**Tableau VII** : Génotype des patients atteints de DEX

Patient	AGE	GENE MUTE	Variation nucléotidique	Variation protéique	Exon muté	Type de mutation	Domaine fonctionnel	Mode de transmission
27	6	EDAR	c.140 G>A c.528+1G>A	p.Cys47Tyr	exon 3 exon 6	Faux-sens Splice	LBD	AR
29	5	EDAR	c.266 G>A c.528+1G>A	p.Arg89His ?	exon 4 exon 6	Faux-sens Splice	LBD	AR
30	3	EDAR	c.1208C>T c.1208C>T	p.Thr403Met p.Thr403Met	exon 12 exon 12	Faux-sens	DD	AR
31	14 mois	EDAR	c.1208C>T c.1208C>T	p.Thr403Met p.Thr403Met	exon 12 exon 12	Faux-sens	DD	AR
32	26	EDAR	c.1208 C>T	p.thr403Met	exon 12	Faux-sens	DD	AR
33	15	EDAR	c.1302G>T	p.Trp434Cys	exon 12	Faux-sens	DD	AR
34		EDAR	c.1259 G>A	p.Arg420Gln	exon 12	Faux-sens	DD	AD
35		EDAR	c.1259 G>A	p.Arg420Gln	exon 12	Faux-sens	DD	AD
36		EDAR	c.1259 G>A	p.Arg420Gln	exon 12	Faux-sens	DD	AD

TNF : Tumor necrosis Factor, LBD : Ligand Binding Domain, DD : Death-Domain, nouvelles mutations pathogènes *EDAR* grisées

**Tableau VIII** : Génotype des patients atteints de DEH autosomique

Domaine fonctionnel de l'EDA muté	Site d'homologie TNF			Site de clivage protéolytique	Site collagen-like	Site intra-cytoplasmique-transmembranaire
Exons mutés du gène <i>EDA</i>	6	7	8	2	4-5	1
<b>N</b>	2	5	3	7	3	1

TNF : Tumor Necrosis Factor

**Tableau IX** : Nombre de patients DEX en fonction des exons du gène *EDA* mutés

Domaine fonctionnel de l'EDAR muté	LBD		DD	
Exons mutés du gène <i>EDA</i>	3	4	6	12
<b>N</b>	1	1	2	6

LBD : Ligand Binding Domain ; DD : Death-domain

**Tableau X** : Nombre de patients atteints de DEH autosomique en fonction des exons du gène *EDAR* mutés

### 2.3.3 Représentativité de l'échantillon de l'étude

De nombreuses autres études traitent des aspects moléculaires de la DEX et permettent d'objectiver la représentativité, sur le plan de l'épidémiologie génétique, de notre groupe de patients [Bayes et coll., 1998 ; Monreal et coll., 1998 ; Pääkkönen et coll., 2001 ; Vincent et coll., 2001; Hashiguchi et coll., 2003 ; Chao et coll., 2003 ; Ramadevi et coll., 2008 ; Tariq et coll., 2008]. De plus, notre étude a mené à l'identification de nouvelles mutations, avec 52,1% des mutations détectées dans notre étude représentant des nouvelles variantes, ce qui se rapproche du taux de 41,1% de nouvelles mutations relevées dans l'étude de Vincent (2001).

La forte représentation des mutations faux-sens dans la DEX correspond aux données épidémiologiques; en effet Vincent (2001) et Pääkkönen (2001) décrivent respectivement 64,7% et 49% de mutations faux-sens du gène *EDA*. Les mutations faux-sens de l'exon 6 du gène *EDA*, responsables des modifications protéiques pHis252Gln et pHis252Asn identifiées chez 2 patients de notre groupe affectent un résidu conservé des ligands Fas, notamment le résidu His 252 particulièrement conservé au sein des ligands TNF et impliqué dans la mise en place du site TNF trimérique extracellulaire (Vincent et coll., 2001). Les ligands Fas homotrimériques appartiennent également à la super-famille TNF et jouent un rôle important dans les mécanismes apoptotiques, après stimulation et trimérisation des récepteurs FasR [Komarov et coll., 2008].

Considérées ensemble, les mutations par délétion dans le cadre de lecture et splice représentent 13% des mutations dans notre étude, ce qui est légèrement inférieur aux 18% de l'étude de Pääkkönen et coll. (2001). Les délétions dans le cadre de lecture concernent les exons 2 et 8 du gène *EDA*, aucune délétion n'étant détectée au niveau des exons 4 et 5 codant pour les répétitions Gly-X-Y du sous-domaine collagénique, contrairement aux observations de Bayès (1998) et Visinoni (2003). En effet, dans ces études, différentes délétions étaient responsables de la perte de répétitions Gly-X-Y, suggérant que les structures collagéniques de l'EDA-A1 sont importantes sur le plan fonctionnel et impliquées fortement dans les mutations pathogènes responsables de la DEX.

Les mutations tronquantes, responsables d'une terminaison transcriptionnelle prématurée et de l'absence d'EDA-A1 fonctionnelle, représentent 31,5% des mutations dans notre groupe de patients DEX, ce qui est proche des données de Pääkkönen et coll. (2001) décrivant une proportion de 33,3% de mutations *EDA* tronquantes, Vincent et coll. décrivant une proportion de 32,3% de mutations tronquantes.

Les différents « clusters » de mutations, observés dans notre étude, formant des points chauds mutationnels au niveau des exons codant pour les différents domaines fonctionnels de l'EDA-A1 ont été également décrits dans d'autres études (Schneider et coll., 2001 ; Pääkkönen et coll., 2001). Les mutations récurrentes observées sur l'exon 2 du gène *EDA*, notamment concernant les résidus 155 et 156 du site de clivage protéolytique de l'EDA (5 familles dans notre étude) ont été également rapportées (Montréal et coll., 1999 ; Vincent et coll., 2001). Ces mutations affectent le site de l'exon 2, riche en dinucléotides CpG (Vincent et coll., 2001). La forte concentration des mutations au niveau des exons codant pour le domaine d'homologie TNF est également décrite et se fait au niveau de résidus fortement conservés dans la famille des facteurs TNF, notamment le feuillet  $\beta$  des ligands CD40 (Bayès et coll., 1998 ; Schneider et coll., 2001 ; Pääkkönen et coll., 2001).

---

### 3. PHÉNOTYPE DENTAIRE

---

#### 3. 1 “GENOTYPES AND DENTAL PHENOTYPE ANALYSES IN 26 FAMILIES WITH X-LINKED AND AUTOSOMAL HYPOHIDROTIC ECTODERMAL DYSPLASIA”

##### *Clinical Genetics, article en préparation*

##### **Objectifs**

Les objectifs de ce travail ont été d'analyser la sévérité du phénotype dentaire de patients affectés par une mutation des gènes *EDA* ou *EDAR* en fonction de leur statut moléculaire.

##### **Méthodes**

Les méthodes d'analyse du phénotype figurent au paragraphe 2.2.2 p.96.

Les corrélations entre le type de gènes mutés, le statut fonctionnel de l'EDA-A1 (mutations tronquantes ou non-tronquantes de gène *EDA*), ainsi que le domaine fonctionnel de l'EDA-A1 muté et la sévérité de l'oligodontie dans la DEX ou la DEH autosomique ont été recherchées. Les comparaisons de paires du nombre d'agénésies maxillaires et mandibulaires, pour les 2 types de dentures et pour l'ensemble des groupes de mutations *EDA-EDAR-TNF* et *Furine*, ont été réalisées par des tests non-paramétriques de Wilcoxon. L'analyse du type de dent préférentiellement touché par les agénésies, pour les groupes de mutations *EDA-EDAR-TNF-Furine*, en denture temporaire et permanente, a été basée sur des tests non-paramétriques de Mann-Whitney.

##### **Résultats**

L'analyse phénotypique porte sur 29 patients présentant une DEX (n=24) ou une DEH autosomique récessive (n=5), dont la mutation est identifiée sur les gènes *EDAR* ou *EDARAD*.

Le diagnostic moléculaire a mené à l'identification de 22 mutations pathogéniques au niveau du gène *EDA* et 5 mutations du gène *EDAR*, 12 de ces mutations n'ayant jamais été identifiées. Les mutations faux-sens du gène *EDA* correspondent à 59% des mutations impliquées dans la DEX et sont localisées au niveau des exons 2, 6, 7 et 8. L'exon 2, codant pour le site de clivage protéolytique, correspond à 46,1% des mutations du gène *EDA* et constitue donc un point chaud de mutation.

Les mutations faux-sens du gène *EDAR* sont localisées sur les exons 3-4, codant pour le LBD (Ligand Binding Domain) et 12 codant le DD (Death-domain intra-cytoplasmique de l'EDAR). Une mutation d'un site donneur de splice de l'exon 6 du gène *EDAR* a été



également localisée. Deux patients étaient hétérozygotes, porteurs respectivement d'une mutation faux-sens de l'exon 3 ou 4 et de la même mutation du site donneur de splice de l'exon 6.

#### Phénotype dentaire et corrélations génotype-phénotype dentaire

En denture temporaire, des phénotypes d'oligodontie sévère ont été identifiés dans la DEX et la DEH autosomique récessive, avec une moyenne respective de 13,6 et 16,5 agénésies. Aucune expression phénotypique différentielle n'a été détectée, concernant le nombre total d'agénésies et le nombre d'agénésies maxillaires ou mandibulaires, entre la DEX et la DEH autosomique récessive en denture temporaire ( $p=0,53$ ) ou en denture permanente ( $p=0,18$ ). Néanmoins, les analyses statistiques ont montré une distribution topographique différentielle des agénésies dentaires en denture temporaire entre les groupes de mutations *EDA* et *EDAR*, les formes autosomiques récessives de DEH étant caractérisées par un nombre supérieur d'agénésies des incisives ( $p=0,02$ ) et canines maxillaires ( $p=0,04$ ), ainsi que des canines mandibulaires ( $p=0,04$ ).

En denture permanente, la DEX et la DEH autosomique ne présentent pas d'expression phénotypique différentielle et sont caractérisées respectivement par un nombre moyen d'agénésies de 22,8 et 21.

La comparaison du phénotype dentaire entre les patients présentant une isoforme *EDA-A1* fonctionnelle (mutations non tronquantes : mutations faux-sens, délétions dans le cadre de lecture) et une isoforme *EDA-A1* non-fonctionnelle (mutations tronquantes : mutations non-sens, mutations frameshift et large délétion génique) a été réalisée.

Le groupe avec mutations non tronquantes du gène *EDA* est caractérisé par un nombre moyen d'agénésies de 13,3 en denture temporaire et 22,5 en denture permanente, alors que le groupe avec mutations *EDA* tronquantes présente en moyenne 14,2 agénésies en denture temporaire et 24 agénésies en denture permanente. Les différences phénotypiques entre les 2 groupes ne sont pas significatives. Néanmoins, les patients présentant les phénotypes les plus sévères d'anodontie sont retrouvés dans le groupe avec mutations tronquantes du gène *EDA*. La sévérité de l'oligodontie des groupes de patients présentant une mutation faux-sens du site clivage protéolytique furine-dépendant de l'*EDA-A1* (exon 2) ou une mutations du site d'homologie TNF (exons 6-8) ne présente pas de différence statistiquement significative en denture temporaire ( $p=0,55$ ) et en denture permanente ( $p=0,18$ ).

Le nombre moyen d'agénésies en denture permanente est de 19 pour les mutations TNF et de 24,4 concernant les mutations du site de clivage. Des phénotypes dentaires modérés sont observés dans le groupe de patients avec mutations TNF, ce qui pourrait être liés à l'existence d'une interaction résiduelle EDA-EDAR.

*Distribution maxillo-mandibulaire des agénésies en denture temporaire et permanente dans les groupes de mutations EDA-EDAR-TNF-Furine* Les analyses statistiques ont montré une oligodontie plus sévère au niveau mandibulaire que maxillaire, pour l'ensemble des patients DEH, en denture temporaire ( $p=0,002$ ) et permanente ( $p=0,0001$ ). Dans le groupe de patients avec mutations *EDA*, le nombre moyen d'agénésies était également significativement supérieur au niveau mandibulaire en denture temporaire ( $p=0,005$ ) et en denture permanente ( $p=0,0004$ ). Le même phénotype mandibulaire sévère a été observé en denture permanente dans le groupe de mutations du site Furine ( $p=0,04$ ) et du site TNF ( $p=0,02$ ). Une altération préférentielle de l'odontogenèse mandibulaire, liée aux dysfonctions moléculaires de la voie de signalisation EDA-NF- $\kappa$ B, est donc observée.

## **Conclusions**

- La sévérité de l'oligodontie en denture temporaire et permanente est comparable dans la DEX (*EDA*) et la DEH autosomique récessive (*EDAR*), confirmant les similarités du phénotype général entre ces deux formes de DEH.
- Une distribution différentielle des agénésies dentaires en denture temporaire entre les groupes de mutations *EDA* et *EDAR* se caractérise par des agénésies plus fréquentes des incisives et canines maxillaires, ainsi que des canines mandibulaires, dans la DEH autosomique récessive avec mutation du gène *EDAR*.
- L'oligodontie est plus sévère au niveau mandibulaire que maxillaire, quelle que soit la mutation considérée.
- Aucune différence significative n'a été relevée entre les mutations tronquantes et non-tronquantes du gène *EDA*, d'une part, et entre les mutations faux-sens des exons codant pour le site furine ou le domaine d'homologie TNF de l'*EDA-A1* d'autre part.

## 3.2 RESULTATS COMPLEMENTAIRES

A côté des analyses du phénotype dentaire en fonction du type de mutation *EDA* et *EDAR* présentées plus haut, nous avons recherché des corrélation entre la sévérité de l'oligodontie et le type de mutations, le type d'exon muté ou de domaine fonctionnel de l'*EDA-A1* muté. De plus, Nous avons comparé de phénotype dentaire et dermatologique pour chaque patient atteint de DEX ou de DEH autosomique. Les éventuelles corrélations entre les manifestations dentaires et le statut moléculaire des patients permettraient d'évaluer le rôle diagnostique du phénotype dentaire par rapport au type de DEH (mutations *EDA* ou *EDAR*), aux types d'exons ou de domaine fonctionnel de l'isoforme *EDA-A1* mutés.

Les aspects cliniques et radiographiques du phénotype dentaire des patients atteints de DEX et de DEH autosomique sont illustrés dans l'annexe 2.

### 3.2.1 Comparaison phénotype dentaire - phénotype dermatologique

Il existe une similitude entre la sévérité du phénotype dentaire et la sévérité des manifestations cutané-phanériennes, à la fois dans la DEX et les formes autosomiques. En effet, les patients présentant une oligodontie sévère sont également atteints d'hypotrichose, d'hypofonctionnement sudoral et de signes cutanés importants (Tableau XI).

Les patients 2 et 5, atteints de mutations faux-sens de l'exon 2 du gène *EDA*, présentent une oligodontie avec respectivement 25 et 26 agénésies en denture permanente et sont caractérisés par des signes dermatologiques et phanériens sévères. Les 2 patients atteints de délétions dans le cadre de lecture du gène *EDA* (respectivement délétion exonique de l'exon 2 et délétion de 9bp de l'exon 8) présentent une oligodontie (délétion exon 2) et une anodontie (délétion exon 8), associées à une hypotrichose, des signes dermatologiques et un hypofonctionnement sudoral sévères (Tableau XI).

A l'inverse, le patient 8, qui présente une mutation faux-sens de l'exon 6 du gène *EDA*, est caractérisé par une oligodontie modérée (10 agénésies en denture permanente) et une absence d'hypotrichose et de signes dermatologiques. Les patients atteints de DEH autosomique dominante présentent également un phénotype cutané-phanérien modéré associé à une hypodontie en denture permanente (Tableau VIII et XI).

### 3.2.2 Explorations des corrélations génotype-phénotype dentaire

Nous avons récapitulé dans le tableau XI l'ensemble des données moléculaires et phénotypiques, en y intégrant les manifestations cutané-phanériennes et dentaires.

En ce qui concerne la sévérité de l'oligodontie en denture temporaire ou permanente, aucune expression phénotypique différentielle n'a été retrouvée entre les différents groupes de mutations *EDA* (Tableaux XII, XIII et XIV).

Un phénotype plus sévère au niveau mandibulaire a été observé pour l'ensemble des types de mutations *EDA*, en denture temporaire ( $p=0,002$ ) ainsi qu'en denture permanente ( $p=0,0001$ ).

Des phénotypes sévères d'anodontie ont été associés à une mutation frameshift de l'exon 4, ainsi qu'à une délétion « inframe » de l'exon 8 du gène *EDA*. Les corrélations génotype-phénotype dentaire ont montré une absence d'expression phénotypique dentaire différentielle entre les patients touchés par une mutation faux-sens de site TNF (exon 6-8 du gène *EDA*) de l'EDA-A1 ou du site de clivage protéolytique furine-dépendant (exon 2). Les mutations touchant le résidu 156 du site de clivage protéolytique furine-dépendant de l'EDA-A1 sont associées à un phénotype d'oligodontie sévère avec une moyenne de 25,4 agénésies en denture permanente ( $n=5$ ), comparé au phénotype avec 22 agénésies pour la mutation affectant le résidu 153 de l'EDA. Le résidu 156 est caractérisé par une forte importance fonctionnelle, étant situé sur 2 sites consensus de reconnaissance de la protéase furine, correspondant aux séquences RVRN (153-156) et RNKR (156-159). Pour les 2 groupes de mutations TNF et Furine, un phénotype dentaire statistiquement plus sévère au niveau mandibulaire a été établi.

Le phénotype dentaire des patients présentant une altération du site d'homologie TNF semble moins sévère en denture permanente chez les patients avec mutations de l'exon 6 du gène *EDA*, caractérisés par une moyenne de 15 agénésies en denture permanente (Fig 23). Un phénotype modéré d'hypodontie est également retrouvé chez un patient présentant une mutation de l'exon 8 du gène *EDA*, avec 4 agénésies en denture temporaire (patient HL). Ces phénotypes moins sévères pourraient être liés à une activité résiduelle de liaison EDA-EDAR, permettant une activité morphogénétique partielle de l'EDA-A1 durant l'odontogenèse.

Néanmoins, une oligodontie sévère est observée chez les patients présentant une mutation faux-sens de l'exon 7 du gène *EDA*, avec une moyenne de 24,3 agénésies en denture permanente. En effet, 2 patients avec mutation de l'exon 7 du gène *EDA* sont caractérisés par une anodontie mandibulaire (Fig 21). La région du domaine d'homologie TNF codée par l'exon 7 pourrait donc être plus importante sur le plan fonctionnel, dans le processus d'interaction EDA-EDAR et d'activation de la voie EDARADD-IKK-NF- $\kappa$ B.

Les mutations frameshift du gène *EDA* sont associées à des phénotypes dentaires variables, sévères pour la mutation frameshift c.579delT de l'exon 4 associée à une anodontie, ou plus modérés pour la mutation frameshift c.572-590 Del de l'exon 4, associée à une hypodontie maxillaire et mandibulaire. Les mutations *EDA* non-sens des exons 1 (c.149C>A) et 4 (c.694C>T) du gène *EDA* sont associées à des phénotypes sévères d'oligodontie en denture permanente avec 23 agénésies (Fig 21). Les mutations non-sens du gène *EDA* au niveau de l'exon 1 et de l'exon 4 sont toutes deux associées à des phénotypes sévères d'oligodontie avec 23 agénésies. Ce type de mutations tronquantes, entraînant une absence d'EDA fonctionnelle dans le milieu extracellulaire, semble donc être associé à des manifestations phénotypiques sévères.

Des phénotypes modérés d'hypodontie ont été observés chez les patients présentant une DEH autosomique dominante (patiente 34 avec 4 agénésies en denture permanente, patients 35 et 36), par rapport aux phénotypes sévères associés à la DEX ou aux DEH autosomiques récessives (Tableau XI).

Une distribution topographique différentielle des agénésies en denture temporaire entre le groupe *EDA* et *EDAR* a été mise en évidence avec les incisives centrales ( $p=0,02$ ) et les canines maxillaires ( $p=0,04$ ), ainsi que les canines mandibulaires ( $p=0,04$ ) étant préférentiellement touchées par les agénésies dans la DEH autosomique récessive (fig. 25-26).

Les analyses statistiques non paramétriques de Mann-Whitney n'ont pas permis de mettre en évidence de corrélations entre le type d'exon du gène *EDA* touché par une mutation faux-sens et la sévérité de l'oligodontie en denture permanente (Fig 22).

Sujet	Age	Diagnostic clinique	Diagnostic moléculaire	Signes dermatologiques	Hypotrichose	Hypofonctionnement sudoral	Nombre d'agénésies en denture temporaire		Nombre d'agénésies en denture permanente	
							maxillaire	mandibule	maxillaire	mandibule
1	7	DEX	Mutation c. 465 C>T exon 2 gène <i>EDA</i>	++	+	++	4	10	10	12
2	5	DEX	Mutation faux-sens c.466 C>T exon 2 gène <i>EDA</i>	+++	+++	++	6	9	12	13
3	4	DEX	Mutation faux-sens c.467 G>A exon 2 gène <i>EDA</i> .	++	-	+	4	8	10	12
4	8	DEX	Mutation faux-sens exon 2 c. 457 C>T gène <i>EDA</i> .	++	++	++	6	8	10	12
5	33	DEX	Mutation faux-sens c.466 C>G exon 2 gène <i>EDA</i>	++	+++	++	ND	ND	13	13
6		DEX	Mutation faux-sens c.467 G>A exon 2 gène <i>EDA</i>	++	+++	++	ND	ND	12	14
7		DEX	Mutation faux-sens c.467 G>A exon 2 gène <i>EDA</i>	++	+++	++	ND	ND	14	14
8	7	DEX	Mutation faux-sens c 756T>G exon 6 du gène <i>EDA</i>	-	-	-	ND	6	3	7
9	51	DEX	Mutation faux-sens c.754C>A de l'exon 6 du gène <i>EDA</i>	++	+++	++	ND	ND	7	13
10	15	DEX	Mutation faux-sens c.871G>A de l'exon 6 du gène <i>EDA</i>	++	++	+	ND	ND	11	12
11	4	DEX	Mutation faux-sens c.896 G>A exon 7 du gène <i>EDA</i>	++	+++	++	8	10	12	14
12	11	DEX	Mutation faux-sens c. 891G >C exon 7 gène <i>EDA</i> .	+++	+	++	4	8	11	13
13	12	DEX	Mutation faux-sens c. 891G >C exon 7 gène <i>EDA</i> .	+++	+	+++	6	8	11	12
14	10	DEX	Mutation faux-sens c. 820 T>C exon 7 gène <i>EDA</i> .	++	+++	++	ND	10	ND	14
15	10	DEX	Mutation faux-sens G1048T exon 8 du gène <i>EDA</i>	+++	+	++	ND	8	8	10
16	2	DEX	Mutation faux-sens c.1067C>T exon 8 gène <i>EDA</i>	+	-	-	2	2	ND	ND
17	40	DEX	Délétion in frame exon 2 gène <i>EDA</i>	+++	+++	+++	ND	ND	9	12
18	4	DEX	mutation délétion in frame 9bp exon 8 gène <i>EDA</i>	+++	+++	+++	9	10	14	14
19		DEX	Mutation c.801 A>G site donneur de splice exon 7				ND	ND	ND	ND

20	9	DEX	Délétion exons 3-8 gène <i>EDA</i>	++	++	+	5	9	11	12
21	7	DEX	Mutation non-sens c.149 C>A exon 1 gène <i>EDA</i>	+	-	+	6	10	10	13
22	8	DEX	mutation non-sens c.694 C>T exon 4 gène <i>EDA</i>	+++	+++	+++	5	8	11	12
23	4	DEX	Mutation frameshift c579Del T exon 4 gène <i>EDA</i>	+++	+++	+++	10	10	14	14
24	3	DEX	Mutation frameshift c.572-590 Del exon 4 gène <i>EDA</i>	+	+	+	4	4	ND	ND
25	9	DEX	Mutation frameshift c884 DelT exon 7 gène <i>EDA</i> .	ND	ND	ND				
26		DEX	Mutation frameshift c884 DelT exon 7 gène <i>EDA</i> .							
27	6	DEH autosomique récessive	Mutations Faux-sens c.540 G>A exon 3 Splice 528+1 G>A exon 6 gène <i>EDAR</i>	++	++	++	6	10	11	14
28	5	DEH autosomique	Mutation gène <i>EDAR</i>	++	-	-	7	6	12	12
29	5	DEH autosomique récessive	Mutations Faux-sens 266 G>A exon 4 c.528+1 G>A exon 6 gène <i>EDAR</i>	-	-	-	6	8	8	10
30	3	DEH autosomique récessive	Mutations c.1208C>T exon 12 gène <i>EDAR</i> +polymorphisme des exons 5, 7, 9, 11	+++	+++	+++	8	8	10 (sous réserve)	12 (sous réserve)
31	14 mois	DEH autosomique récessive	Mutations c.1208 C>T exon 12 gène <i>EDAR</i> +polymorphisme des exons 5, 7, 9, 11	+++	+++	+++	10	10	ND	ND
32	26	DEH autosomique récessive	Mutations c.1208 C>T exon 12 exon 12 gène <i>EDAR</i> +polymorphisme des exons 5, 7, 9, 11	-	-		ND	ND	2	0
33		DEH autosomique récessive	Mutation c.1302G>T exon 12 gène <i>EDAR</i>	+	++	++	ND	ND	7	10
34		DEH autosomique dominante	c.1259G>A exon 12 gène <i>EDAR</i>	-	-	-			2	2
35	15	DEH autosomique dominante	Mutation c.1259 G>A Exon 12 gène <i>EDAR</i>	-	-	-	ND	ND	0	0

<b>36</b>	12	DEH autosomique dominante	Mutation c.1259 G>A exon 12 gène EDAR	-	-	-	ND	ND	0	4
<b>37</b>	27	DEH	ND	+++	+++	+++	ND	ND	11	14
<b>38</b>	27	DEH	ND	+++	+++	+++	ND	ND	10	13
<b>39</b>	11	DEH : suspicion de mutation du gène <i>NEMO</i>	ND	-	--	-	ND	ND	6	10
<b>40</b>	18	DEH	ND	++	++	+++	ND	ND	10	12
<b>41</b>	25	DEH	ND	+++	+++	+++	ND	ND	8	13
<b>42</b>	29	DEH	ND	-	+	-	ND	ND	12	10
<b>43</b>	17	DEH	ND	-	-	-				
<b>44</b>	17	DEH	ND							
<b>45</b>	6	DEH	ND	++	++	++	8	9	12	14

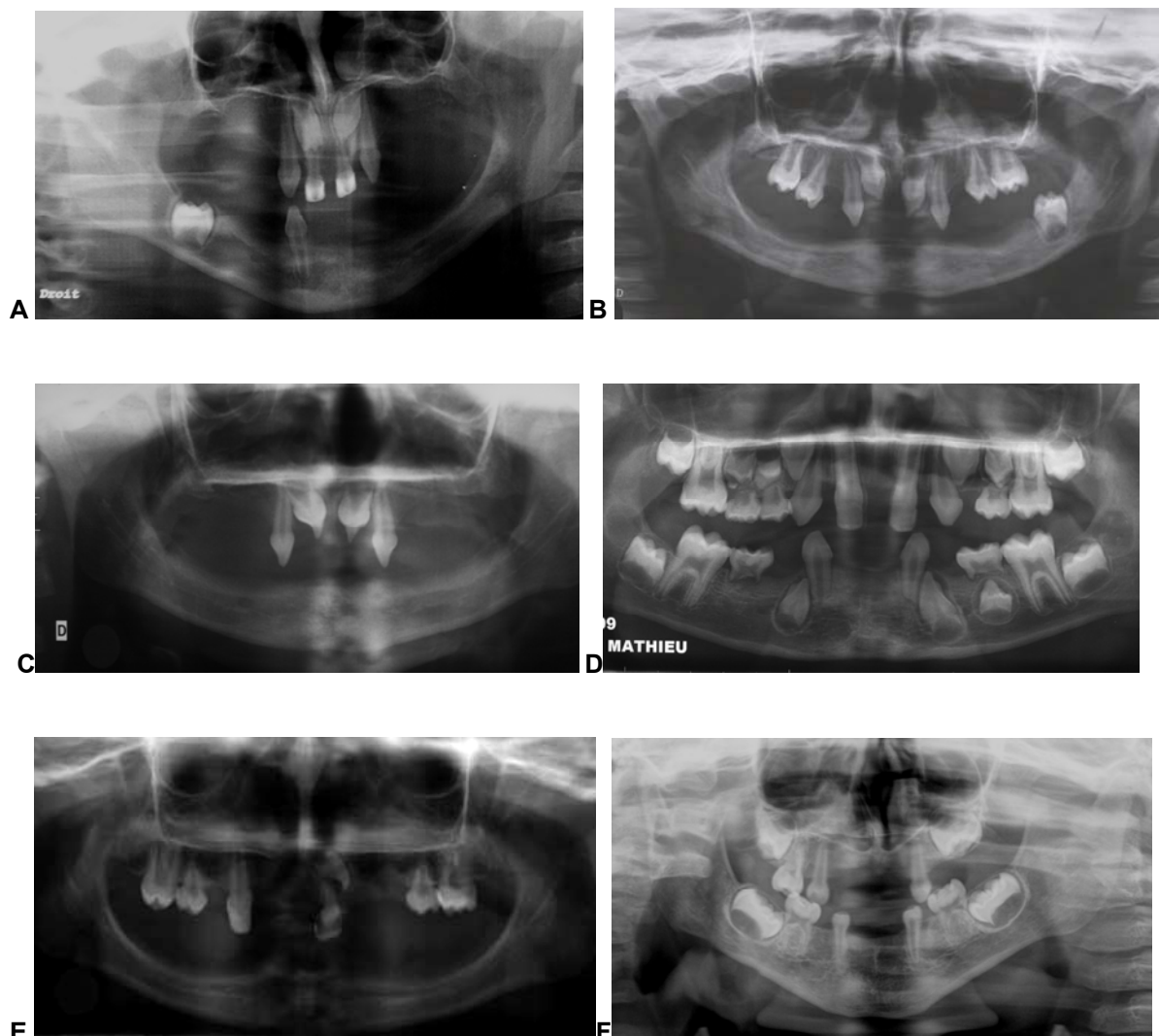
ND : Non déterminé

**Tableau XI** : Age, diagnostics cliniques et moléculaires, nombre d'agénésies des patients DEH, classés en fonction du diagnostic moléculaire.





**Fig 20** : Phénotypes dentaires associés à la DEX (A-C) et à la DEH autosomique récessive (D) :  
 dysmorphies coronaires (incisive et canines conoïdes : A-D) et oligodontie de sévérité variable.  
 Phénotypes associés à une mutation faux-sens de l'exon 7 du gène *EDA* (A), une mutation faux-  
 sens de l'exon 6 (B), une large délétion génique des exons 3-8 (C) et une mutation *EDAR*.



**Fig 21** : Aspects radiographiques des phénotypes dentaires observés chez des patients présentant une mutation faux-sens de l'exon 2 (A) et non-sens de l'exon 1 (B): oligodontie sévère mandibulaire, avec présence d'une seule molaire permanente et oligodontie maxillaire. Oligodontie sévère observée chez un patient avec une mutation faux-sens de l'exon 7 (C) et oligodontie modérée liée à une mutation faux-sens de l'exon 6 du gène *EDA* (D). Oligodonties sévères associées à la DEH autosomique récessive avec mutation *EDAR* (E-F).

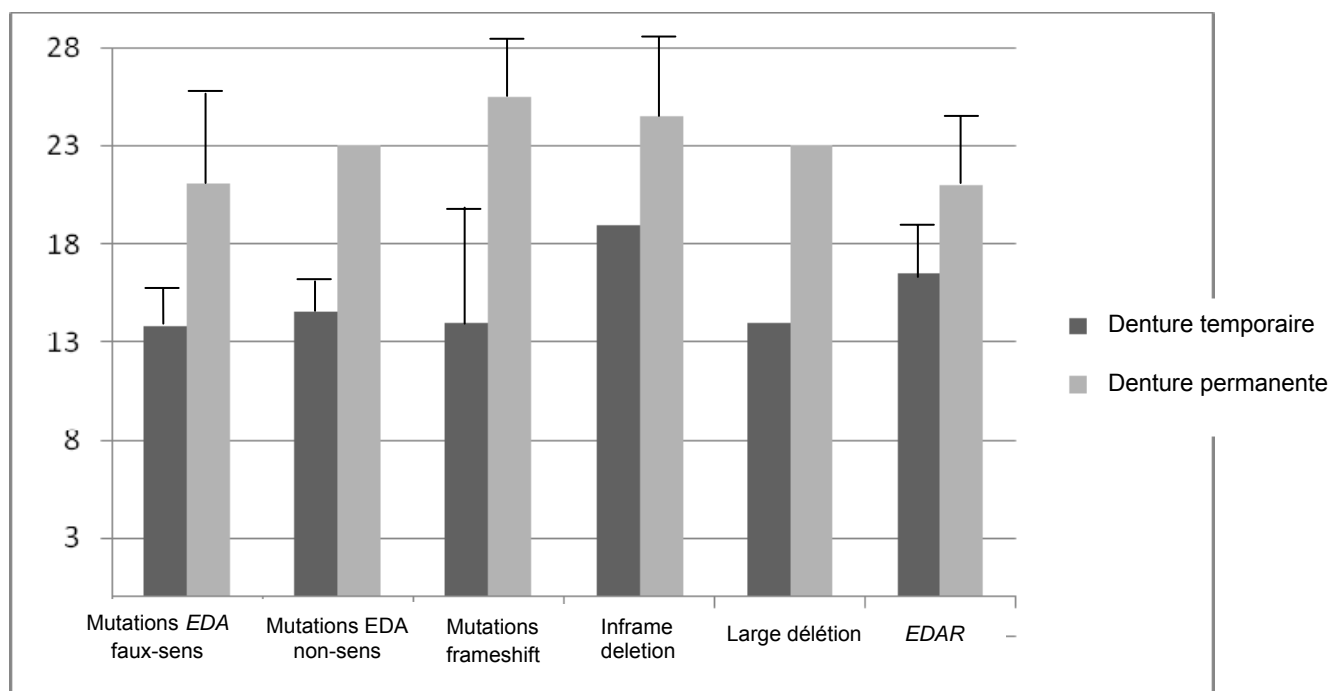
**Sévérité de l'oligodontie en denture temporaire et permanente des patients avec mutations faux-sens, non-sens, « inframe deletion », mutation frameshift ou délétion génique du gène *EDA* et mutations du gène *EDAR*.**

Génotype	Nombre d'agénésies en denture temporaire	Nombre d'agénésies maxillaires en denture temporaire	Nombre d'agénésies mandibulaires en denture temporaire
Mutations faux-sens gène <i>EDA</i>	13,8+/-1,4	5,7+/-1,6	8,4+/-1,2
Mutations non-sens gène <i>EDA</i>	14,5+2,1	5,5+/-0,7	9+/-1,4
Mutations frameshift gène <i>EDA</i>	14+/-8,4	7+/-4,2	7+/-4,2
Inframe deletions gène <i>EDA</i>	19	9	10
Large délétion génique gène <i>EDA</i>	14	5	9
Mutations gène <i>EDAR</i>	16,5+/-2,5	7,5+/-1,9	9+/-1,1

**Tableau XII** : Nombre moyen d'agénésies en denture temporaire fonction du type de mutation du gène *EDA* (faux-sens, non-sens, frameshift, large délétion génique, délétion in frame, *EDAR*)

Génotype	Nombre d'agénésies en denture permanente	Nombre d'agénésies maxillaires en denture permanente	Nombre d'agénésies mandibulaires en denture permanente
Mutations faux-sens gène <i>EDA</i>	21,1+/-4,7	10,2+/-2,8	12,3+/-1,9
Mutations non-sens gène <i>EDA</i>	23+/-0	10,5+/-0,7	12,5+/-0,7
Mutations frameshift gène <i>EDA</i>	25,5+/-3,5	11,5+/-3,5	14+/-0
Inframe deletions gène <i>EDA</i>	24,5+/-4,9	11,5+/-3,5	13+/-1,4
Large délétion génique gène <i>EDA</i>	23	11	12
Mutations gène <i>EDAR</i>	21+/-4	9,5+/-2,3	11+/-2

**Tableau XIII** : Nombre moyen d'agénésies en denture permanente fonction du type de mutation du gène *EDA* (faux-sens, non-sens, frameshift, large délétion génique, délétion in frame, *EDAR*)

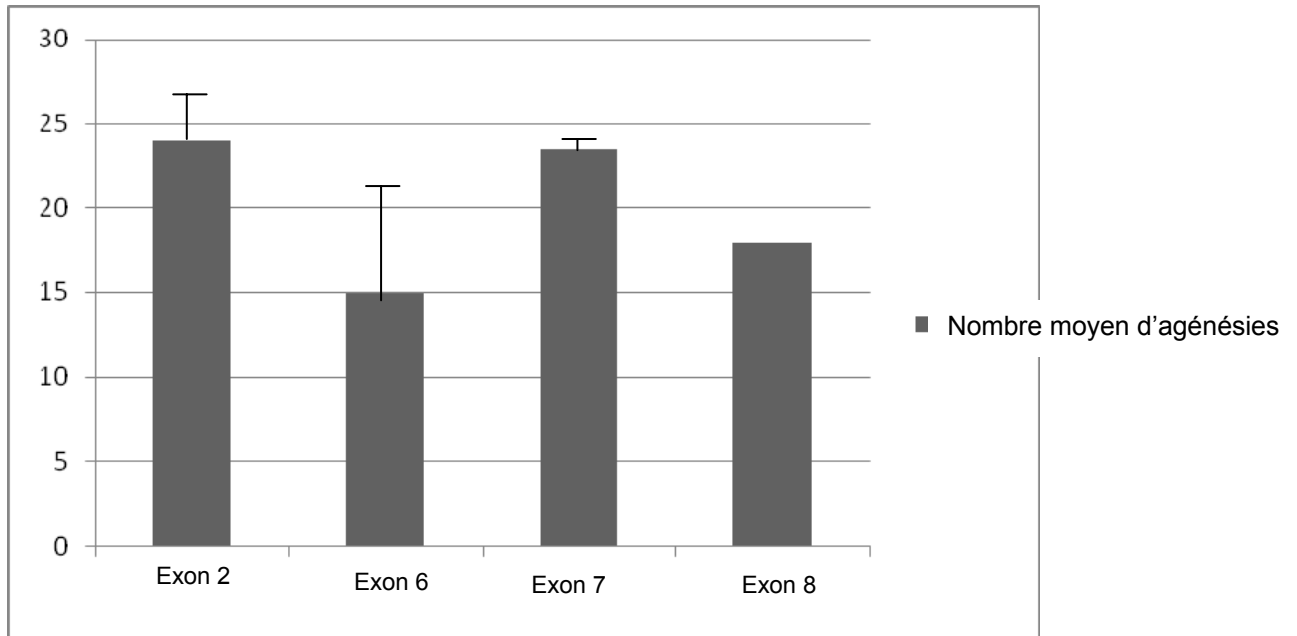


**Fig 22 :** Nombre moyen d'agénésies en denture temporaire et permanente en fonction du type mutationnel du gène *EDA*.

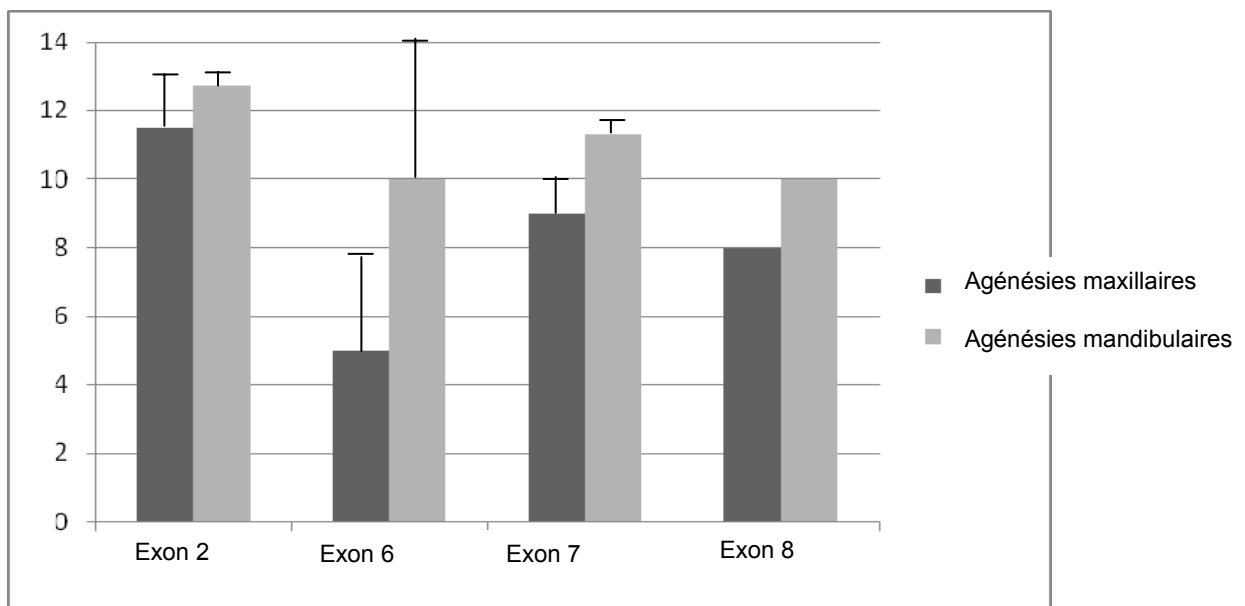
**Sévérité de l'oligodontie en denture permanente des patients DEX porteurs de mutations faux-sens des exons 2, 6, 7 ou 8 du gène *EDA***

Type de mutations	Nombre d'agénésies en denture permanente	Nombre d'agénésies maxillaires	Nombre d'agénésies mandibulaires
<b>Mutations faux-sens exon 2 gène <i>EDA</i></b>	24+/-2,4	11,5+/-1,6	12,7+/-0,9
<b>Mutations faux-sens exon 6 gène <i>EDA</i></b>	15+/-7	5+/-2,8	10+/-4,2
<b>Mutations faux-sens exon 7 gène <i>EDA</i></b>	23,5+/-0,7	9+/-1,1	11,3+/-0,5
<b>Mutations faux-sens exon 8 gène <i>EDA</i></b>	18	8	10

**Tableau XIV :** Nombre moyen d'agénésies en denture temporaire en fonction de l'exon du gène *EDA* muté.

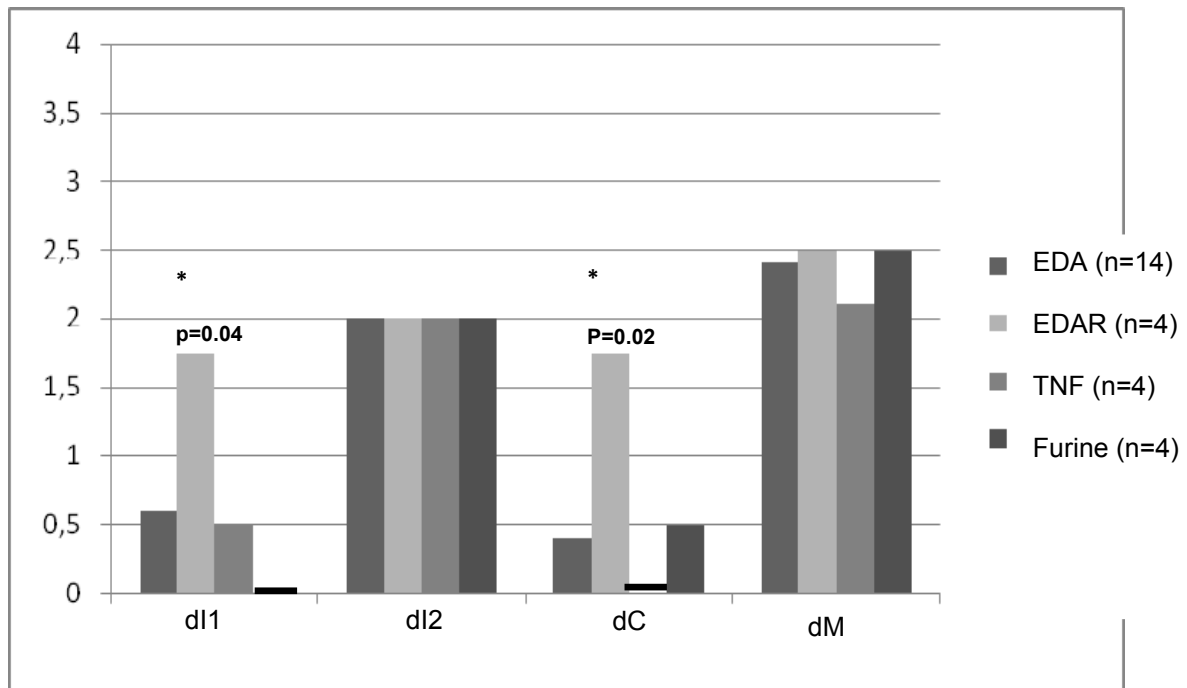


**Fig 23** : Nombre moyen d'agénésies en denture permanente en fonction de l'exon du gène *EDA* muté.

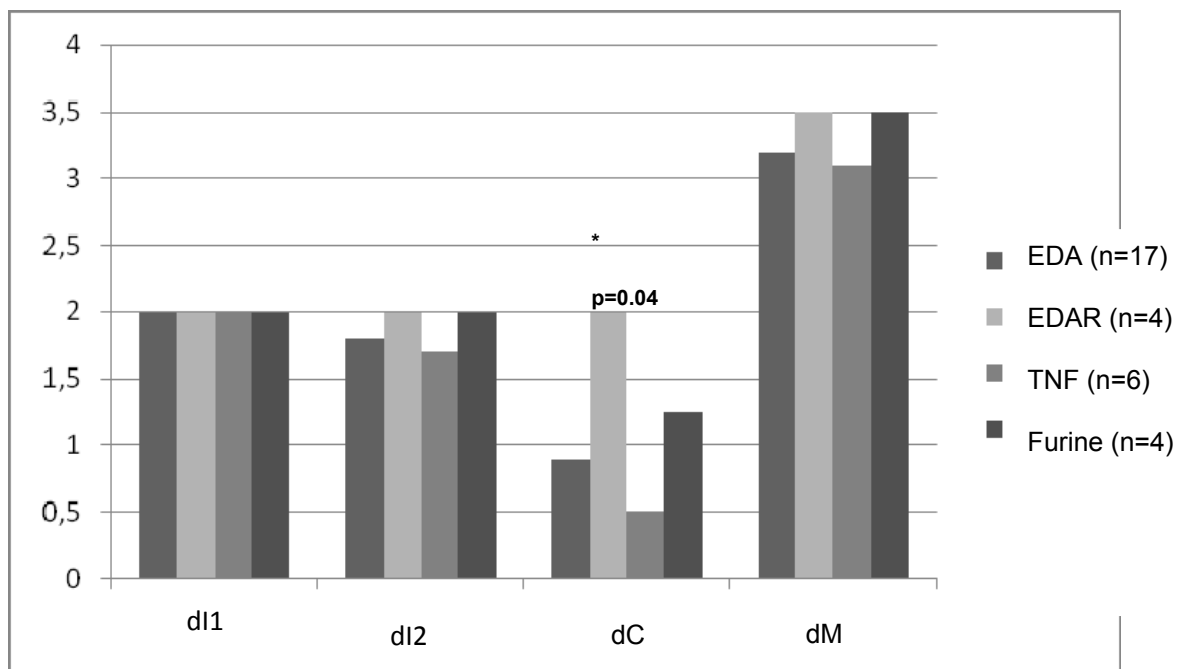


**Fig 24** : Nombre moyen d'agénésies maxillaires et mandibulaires en denture permanente fonction de l'exon du gène *EDA* muté.

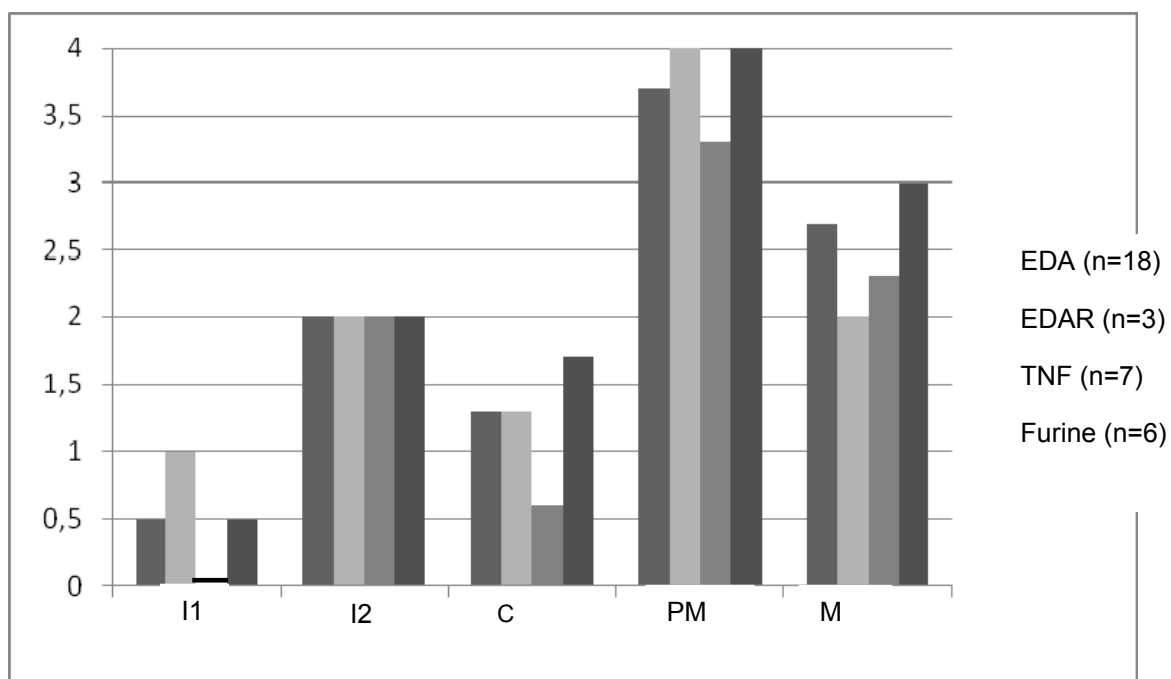
**Type de dents touchées par les agénésies en denture temporaire et permanente en fonction des mutations en comparant EDA et EDAR d'une part et TNF-Furine d'autre part.**



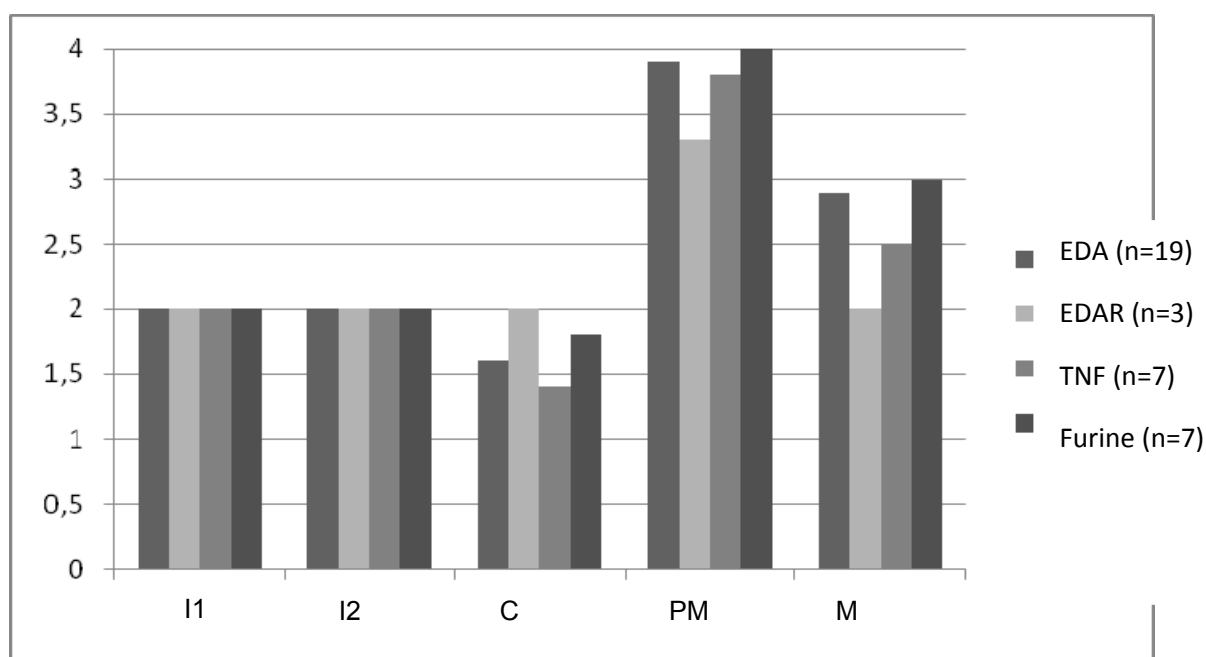
**Fig 25 :** Distribution topographique des agénésies dentaires maxillaires en denture temporaire, pour les mutations *EDA* comparées à *EDAR* et les mutations *TNF* comparées à *Furine*.



**Fig 26 :** Distribution topographique des agénésies dentaires mandibulaires en denture temporaire, pour les mutations *EDA* comparées à *EDAR* et les mutations *TNF* comparées à *Furine*.



**Fig 27 :** Distribution topographique des agénésies dentaires maxillaires en denture permanente EDA vs EDAR et TNF vs Furine



**Fig 28 :** Distribution topographique des agénésies dentaires mandibulaires en denture permanente EDA vs EDAR et TNF vs Furine

### 3.2.3 Discussion

Des phénotypes sévères d'oligodontie sont associés aux formes liées à l'X et autosomiques de DEH. Les analyses statistiques ont montré que le phénotype dentaire mandibulaire était systématiquement plus sévère que le phénotype maxillaire [Clauss et coll., 2008 en préparation]. L'oligodontie est aussi sévère dans la forme autosomique récessive de DEH que dans la DEX. Ces observations confirment le caractère sévère du phénotype associé aux formes autosomiques récessives de DEH avec mutations du gène *EDAR* [Van der Hout et coll., 2008]. En revanche, la distribution différentielle des agénésies en denture temporaire entre les groupes *EDA* et *EDAR*, qui a été mise en évidence dans notre étude, pourrait constituer un marqueur phénotypique de distinction entre DEX et DEH autosomique récessive. En effet, l'absence préférentielle des incisives centrales et canines maxillaires ainsi que des canines mandibulaires devrait permettre d'orienter le diagnostic clinique et moléculaire vers une DEH autosomique récessive. Aswegan et coll. (1997) rapportent que les canines maxillaires présentent une stabilité importante, ce qui est en opposition avec nos observations phénotypiques. Dans notre étude, les incisives mandibulaires sont systématiquement absentes, tant en denture temporaire que permanente, ce qui est en accord avec d'autres auteurs décrivant une absence préférentielle des incisives mandibulaires [Lind et coll., 2006].

La forme autosomique dominante de DEH avec mutation du gène *EDAR* est, quant à elle, caractérisée par une expression phénotypique modérée par rapport à la DEH autosomique récessive ou la DEX, confirmant certaines données phénotypiques déjà publiées sur la DEH autosomique dominante [Lind et coll., 2006].

L'effectif de notre population est déséquilibré entre les groupes « mutation *EDA* » et « mutation *EDAR* », et le nombre de patients DEX pour chaque exon ou domaine fonctionnel de l'*EDA* muté est relativement faible. De ce fait, ceci pourrait constituer une des raisons pour lesquelles nous n'avons pu établir de corrélations statistiques entre la sévérité de l'oligodontie et le type mutationnel. La variabilité du phénotype dentaire au sein de chaque groupe de mutations constitue un autre des facteurs expliquant la difficulté à établir des corrélations génotype-phénotype dans la DEX [Kobiela et coll., 2001 ; Lexner et coll., 2008]. Les plus fortes variabilités phénotypiques sont observées dans le groupe des mutations frameshift en denture temporaire et dans les groupes de mutations *EDA* faux-sens et délétions dans le cadre de lecture.

Le rôle diagnostique et pronostique du phénotype dentaire par rapport au type d'exon ou de domaine fonctionnel de l'*EDA*, ainsi qu'à la sévérité générale de la DEH, devrait être confirmé par des études complémentaires.



La distribution topographique des agénésies dentaires associées à la DEX montre un effet plus marqué de la mutation *EDA* sur l'odontogenèse mandibulaire. L'existence d'un code odontogène de gènes homéotiques a été montrée chez la souris [Cobourne et coll., 2003], avec des gènes exprimés au niveau de l'ectomésoenchyme mandibulaire (*Msx1* et *Msx2*, *Dlx5/Dlx6* et *Aix3*) et impliqués dans la régionalisation, la spécification et la différenciation des patrons dentaires [Cobourne et coll., 2003]. La mutation *EDA* semble altérer l'expression des gènes homéotiques au niveau mandibulaire, ce qui pourrait être lié aux interactions moléculaires entre la voie EDA-NF-κB et BMP-*Msx1* ou FGF-*Msx1* [Pispa et coll., 1999 ; Pummila et coll., 2007].

La distribution topographique des agénésies dentaires dans la DEX présente des similarités avec les oligodonties non syndromiques liées aux mutations des gènes homéotiques *Msx1* et *Pax9* [Jowett et coll., 1993 ; Vastardis et coll., 1996 ; Nieminen et coll., 2001 ; Arte et coll., 2001 ; Ogawa et coll., 2006]. En effet, dans ce type d'oligodontie non syndromique, les agénésies les plus fréquentes touchent les secondes prémolaires et troisièmes molaires pour les mutations *Msx1*, ou les secondes et troisièmes molaires pour les mutations *Pax9* [Vastardis et coll., 1996 ; Nieminen et coll., 2001]. Ces similarités phénotypiques suggèrent des mécanismes moléculaires communs entre les oligodonties syndromiques et non syndromiques, notamment via les interactions entre EDA et *Msx1-Pax9* [Pummila et coll., 2007].

Des analyses de la structure quaternaire de la protéine EDA homotrimérique permettraient d'étudier l'effet des mutations sur l'interaction EDA-EDAR et sur la structure globale de la molécule (Li et coll., 2008).

---

## 4. CHAMPS MORPHOGENETIQUES DANS LA DENTITION HUMAINE

---

L'ensemble des anomalies de l'odontogenèse décrites précédemment, et liées à la mutation *EDA*, montre le rôle important de la voie de signalisation EDA-NF-κB dans le développement dentaire. L'intégration de l'EDA dans les différentes théories morphogénétiques et le rôle des facteurs génétiques et épigénétiques font l'objet de la publication B « Champs morphogénétiques dans la dentition humaine : une nouvelle synthèse clinique d'un ancien concept ».

**PUBLICATION B « MORPHOGENETIC FIELDS WITHIN THE HUMAN DENTITION : A NEW CLINICALLY RELEVANT SYNTHESIS OF AN OLD CONCEPT »**

*Archives of Oral Biology, sous presse*

La théorie des champs morphogénétiques (théorie de Butler adaptée par Dahlberg) et la théorie clonale (Osborne) ont été réadaptées dans cette publication à la lumière de la théorie du code odontogène de gènes homéotiques (Sharpe). Une synthèse de ces trois théories, apparaissant complémentaires et non contradictoires, est proposée au sein de la théorie unifiée des interactions génétiques coopératives (Mitsiadis et Smith), en considérant le rôle de molécules de signalisation comme l'EDA dans la morphogenèse dentaire. Le rôle des facteurs épigénétiques et environnementaux dans la variabilité phénotypique dentaire est également décrit grâce au modèle des jumeaux monozygotes et intégré à la théorie des interactions génétiques coopératives.

### **Théorie des champs morphogénétiques et théorie clonale**

La théorie des champs morphogénétiques trouve son origine au XIX<sup>ème</sup> siècle dans les observations paléontologiques de la variabilité morphologique des éléments dentaires appartenant aux vertébrés supérieurs. Les observations de Bateson, reprises par Huxley et De Beer, ont porté sur l'hétéroodontie des vertébrés et l'existence de champs morphogénétiques expliquant les variations méristiques dentaires des vertébrés. Les études phylogénétiques de Butler ont montré qu'il existe au sein de chaque champ morphogénétique un gradient de taille, un gradient de complexité morphologique et un gradient de variabilité.

A l'opposé de la théorie des champs morphogénétiques, la théorie clonale proposée par Osborne, montre qu'il existe pour chaque classe (incisives, canines, prémolaires et molaires) un type de clone cellulaire pré-programmé.

La théorie du code odontogène de gènes homéotiques, suggère, quant à elle, que l'expression spécifique de différents gènes homéotiques au sein de domaines d'expression de l'ectomésenchyme dérivé des crêtes neurales céphaliques (Sharpe et coll., 1995). Des patrons de différenciation dentaire sont établis grâce à différentes molécules de signalisation (BMP, EDA), d'origine ectodermique, entraînant l'expression de gènes homéotiques au niveau de l'ectomésenchyme du premier arc branchial.

### **Rôle de l'EDA et théorie des interactions génétiques coopératives**

A côté des gènes homéotiques, l'EDA apparaît comme une molécule morphogénétique essentielle dans la définition de la taille des patrons de différenciation dentaire. En effet, les mutations du facteur EDA, ainsi que de son récepteur EDAR et de l'Ectodysplasine Receptor Associated Death-Domain (EDARADD) entraînent des agénésies dentaires et des anomalies morphologiques chez les modèles murins mutants [Peterkova et coll., 2002].

Le modèle murin Tabby, présentant une mutation du facteur Ta, est également caractérisé par l'existence de différents morphotypes molaires, liés à des anomalies de l'apoptose et de la segmentation de l'épithélium odontogène [Boran et coll., 2005].

L'importance de la voie de signalisation EDA-EDAR-EDARADD-NF- $\kappa$ B est démontrée par le phénotype de patients atteints de mutations du gène *EDA* (DEX) ou des gènes *EDAR* et *EDARADD* mutés dans les formes autosomiques dominantes et récessives de DEH, atteints de formes variables d'oligodontie [Lind et coll., 2006]. Le phénotype dentaire des formes autosomiques récessives est plus sévère que celui des formes autosomiques dominantes de DEH (Chassaing et coll., 2006). Une variabilité phénotypique dentaire est observée entre différents patients atteints de DEH autosomique, vraisemblablement liée à la variabilité génétique et aux effets différentiels des mutations *EDAR* et *EDAR* sur la trimérisation du récepteur EDAR ou sur les interactions EDA-EDAR et EDAR-EDARADD.

La synthèse de l'ensemble des théories pour expliquer les mécanismes de définition des patrons dentaires est proposée par Mitsiadis et Smith (2006) dans la théorie des interactions génétiques coopératives. Les champs morphogénétiques, les clones et les gènes homéotiques odontogènes sont considérés et jouent tous un rôle important dans la morphogenèse dentaire. Les cellules mésenchymateuses des crêtes neurales céphaliques (clones) sont influencées par les molécules de signalisation exprimées au niveau ectodermique (champ) et expriment différents gènes homéotiques.

## **Facteurs génétiques, épigénétiques et environnementaux dans la morphogenèse dentaire**

Différents facteurs génétiques et morphogénétiques interviennent dans l'odontogenèse. La variation temporo-spatiale de l'expression des molécules de signalisation entraîne différents phénotypes. Trois mécanismes principaux sont impliqués dans la mise en place de patrons de différenciation : les mécanismes cellulaire-indépendant, les mécanismes inductibles et les mécanismes morphogénétiques. La première catégorie correspond à la mise en place de groupes cellulaires sans interactions cellulaires, la seconde catégorie fait appel aux interactions entre cellules avec modifications de leur phénotype alors que le troisième mécanisme correspond aux interactions intercellulaires sans modifications du phénotype cellulaire.

Les mécanismes épigénétiques, correspondant à tous les facteurs intervenant au niveau tissulaire durant le développement dentaire, au-delà de l'acétylation et de la méthylation de l'ADN, jouent un rôle dans la variabilité phénotypique dentaire. En effet, des jumeaux monozygotes atteints d'une mutation *EDA*, sont caractérisés par des tableaux d'oligodontie et de distribution des agénésies différents. Ces observations sont en faveur de facteurs épigénétiques locaux, intervenant, à côté des facteurs génétiques, dans le tableau phénotypique dentaire. Un modèle multi-factoriel intégrant les facteurs génétiques, épigénétiques et environnementaux, plutôt qu'une transmission monogénique, explique donc les variations phénotypiques chez les jumeaux monozygotes.

### **Conclusions**

- La théorie des champs morphogénétiques, la théorie clonale et la théorie du code odontogène combinatoire de gènes homéotiques peuvent être intégrées dans une même théorie des interactions génétiques coopératives pour expliquer les mécanismes morphogénétiques impliqués dans l'odontogenèse.
- Les cellules mésenchymateuses issues des crêtes neurales céphaliques (clones) sont influencées par les molécules de signalisation exprimées au niveau ectodermique (champ).
- La voie EDA-NF- $\kappa$ B peut intervenir dans l'établissement des champs morphogénétiques.
- L'odontogenèse est néanmoins un phénomène complexe, faisant intervenir des mécanismes génétiques bien documentés, mais également des facteurs épigénétiques variables.

---

## 5. PHENOTYPE OSSEUX MANDIBULAIRE ASSOCIE A LA DEH

---

Des observations phénotypiques réalisées chez l'homme à partir d'examens tomodensitométriques [Clauss et coll., 2008 sous presse], ainsi que certaines données cliniques issues de la phase chirurgicale implantaire et de l'ostéointégration [Bergendal et coll., 2008], ont suggéré que des modifications structurales osseuses mandibulaires pouvaient être associées à la DEX. Ces observations cliniques nous ont menées à l'étude des phénotypes osseux mandibulaires et maxillaires dans la DEX.

### 5.1 « X-linked hypohidrotic ectodermal dysplasia consequences on jaw bone in human: preliminary results »

*Frontiers of Oral Biology, en préparation*

#### **Objectifs**

Cette publication vise une caractérisation des modifications morphologiques et structurales osseuses mandibulaires dans la dysplasie ectodermique hypohidrotique liée à l'X (DEX) chez l'homme. Des relations entre le phénotype osseux et le phénotype dentaire dans la DEX sont également recherchées.

#### **Résumé**

Les examens scannographiques ont mis en évidence des altérations morphologiques mandibulaires consistant en une hypotrophie et la présence d'une exostose osseuse sous forme de crête. Les anomalies structurales osseuses retrouvées dans la DEX sont des hyperminéralisations osseuses médullaires et une hypercorticalisation mises en évidence sur les coupes scannographiques, les profils densitométriques et les reconstructions tridimensionnelles mandibulaires. Ces zones d'hyperminéralisation médullaire, non retrouvées chez des patients contrôles, sont objectivées sur les reconstructions tridimensionnelles mandibulaires en isosurface. Des variations locales de la densité osseuse médullaire sont également observées, entre les régions mandibulaires antérieures et postérieures. La densité osseuse corticale mandibulaire, évaluée en Unités Hounsfields, était plus importante chez les patients DEX, par rapport aux patients contrôles.

Les anomalies morphologiques osseuses mandibulaires semblent être liée à l'absence de développement dentaire, alors que les augmentations de la densité osseuse apparaissent, quant à elle, indépendantes du phénotype dentaire. En effet, une augmentation de la densité corticale maxillaire, aussi bien alvéolaire, que basale est observée.

L'hypotrophie osseuse observée chez l'homme, est également retrouvée par micro-tomographie chez la souris Tabby, cette hypotrophie étant en rapport avec l'absence des incisives. Les modifications structurales osseuses pourraient être liées à l'altération des fonctions de la voie de signalisation EDA-NF- $\kappa$ B dans l'ostéogenèse, les transcrits du gène *EDA* étant exprimés au niveau des ostéoblastes durant le développement embryonnaire humain. Un défaut des processus de remodelage osseux pourrait également être impliqué dans le phénotype de la DEX, étant donné le rôle de la voie de signalisation NF- $\kappa$ B dans les fonctions ostéoclastiques.

## 5.2 RESULTATS COMPLEMENTAIRES

Les scanners ainsi que les tableaux de valeurs de densité osseuse des patients inclus dans ce protocole figurent en annexe 3 de la thèse.





L'étude des coupes scannographiques mandibulaires orthoradiales des patients DEH révèle de fortes densités osseuses, de type D1 ou D2 selon la classification de Lekholm et Zarb, quel que soit l'âge du patient ou son génotype (Tableau XV).

Les densités D1 et D2 correspondent à des densités osseuses élevées, avec présence d'une corticale prédominante entourant un espace osseux médullaire réduit (D1), ou plus important (D2).

Les patients DEH les plus jeunes sont caractérisés par une densité osseuse mandibulaire inférieure de type D2 (Tableau XV). L'examen scannographique du patient 21 révèle un os cortical homogène d'épaisseur moyenne, entourant une zone centrale relativement importante d'os médullaire faiblement minéralisé correspondant à la densité osseuse D2 [Lekholm et Zarb, 1985]. La mutation du site intracytoplasmique-transmembranaire de l'EDA-A1 est associée, chez ce patient, à un phénotype osseux de minéralisation modérée. Néanmoins une hypercorticalisation a été mise en évidence chez ce patient, par la mesure de l'épaisseur de la corticale linguale de 3,3 mm dans le sens sagittal (annexe 3).

Une densité osseuse de type D1 est observée chez le patient 14 âgé de 10 ans. En effet, l'incidence orthoradiale mandibulaire montre un phénotype osseux hyper-minéralisé de type D1 selon la classification de Lekholm et Zarb. Un phénotype d'hyper-minéralisation osseuse médullaire (Fig 29) est observé en association avec une mutation du site d'homologie TNF de l'EDA. Les zones médullaires d'hyperminéralisation osseuse sont mises en évidence sur la reconstruction tridimensionnelle en isosurface, réalisée à partir des coupes scannographiques (Fig 29).

Les patients DEH plus âgés sont caractérisés par une densité osseuse mandibulaire importante de type D1 (patients 9, 37, 38 et 41: Fig 30), ou une densité D2 retrouvée chez le patient 17 (annexe 3). En effet, l'examen scanographique du patient 17 montre dans le plan sagittal un os mandibulaire minéralisé de type D2. La coupe transversale permet d'observer des zones d'hyperminéralisation médullaire focale distribuées dans l'ensemble de la région symphysaire (annexe 3). Ce phénotype d'hyperminéralisation osseuse importante avec présence d'une zone médullaire est observé chez un patient présentant une mutation par délétion exonique complète de l'exon 2 du gène *EDA*, codant pour le site de clivage protéolytique de l'EDA. Une hypercorticalisation de la région symphysaire médiane a été mise en évidence chez le patient 17 avec une corticale de 6 mm dans le plan sagittal comparée à la corticale mandibulaire de 2 mm pour le patient contrôle (annexe 3). Un phénotype d'hyper-corticalisation est donc observé en association, dans ce cas, avec la mutation de l'exon 2 du gène *EDA*.

Densité osseuse selon la classification de Lekholm et Zarb	Aspects de la structure osseuse	Patients	Age	Génotype
<b>D1</b> : L'ensemble de l'os est constitué d'os cortical compact homogène.		9 14 37 38 41	51 10 27 27 25	c.754C>A exon 6 gène <i>EDA</i> c.820T>C exon 7 gène <i>EDA</i> en cours en cours en cours
<b>D2</b> : Une couche importante d'os cortical compact entoure une zone d'os trabéculaire dense.		21 17 43 44 Ctrl 2	7 40 17 17 48	c.149C>A exon 1 gène <i>EDA</i> Del 503-526 exon 2 gène <i>EDA</i> en cours en cours
<b>D3</b> : Une mince couche d'os compact entoure une zone importante d'os trabéculaire.		Ctrl1 Ctrl 3 Ctrl 4	73 89 67	
<b>D4</b> : Une mince couche d'os cortical entoure une zone importante d'os trabéculaire de faible densité.				

**Tableau XV:** Patients DEH en fonction de leur densité osseuse selon Lekholm et Zarb, leur génotype et leur âge (adapté de de Oliveira et coll., 2008).

L'examen scannographique mandibulaire du patient 9 révèle un os hyper-minéralisé de type D1. En effet, un os cortical compact homogène fortement minéralisé est observé en l'absence d'une zone médullaire trabéculaire centrale, ce qui correspond à la définition d'un os de type D1. Un phénotype d'hyper-minéralisation osseuse est observé chez ce patient, dont le diagnostic



moléculaire est une mutation faux-sens c.754C>A au niveau de l'exon 6 du gène *EDA* responsable de la modification protéique p.his252Asn du domaine d'homologie TNF de l'EDA (Fig 30). Les profils densitométriques osseux réalisés chez le patient 9 montrent une hyperdensité osseuse médullaire avec une densité D1 comparée à une densité médullaire D4 au niveau du profil densitométrique contrôle (annexe 3). En effet, au niveau de la courbe contrôle, seules les corticales sont caractérisées par une densité D1 avec un espace inter-cortical hypodense de densité osseuse D4. Ces données suggèrent une hyperminéralisation osseuse médullaire observée chez le patient 9 (annexe 3).

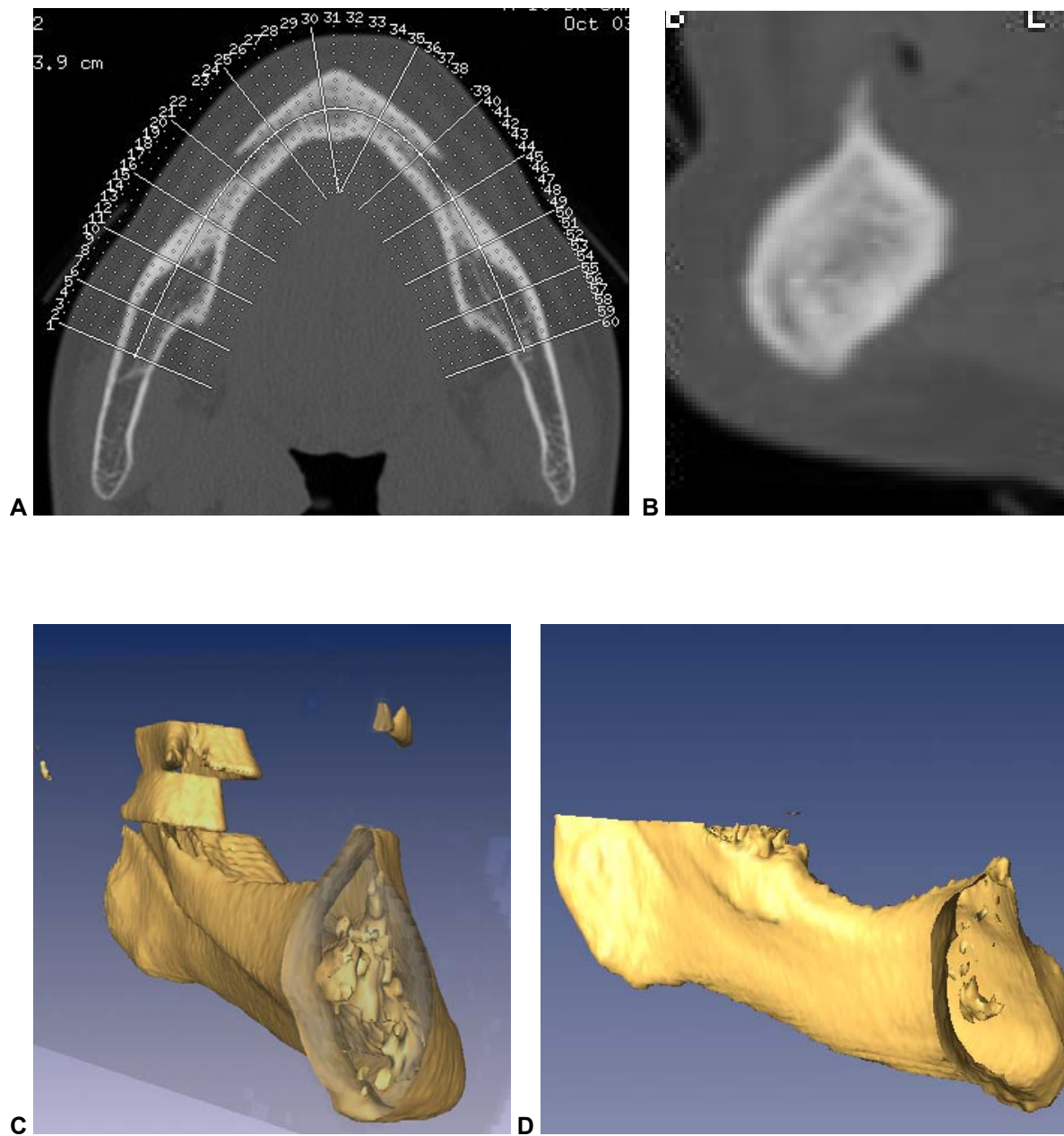
Concernant les patients 37 et 38, jumeaux monozygotes atteints de DEH, les incidences orthoradiales mandibulaires montrent un os fortement minéralisé avec une corticale épaisse et homogène prédominante en l'absence de zone centrale médullaire (Fig 30). Ces caractéristiques phénotypiques osseuses correspondent donc à la définition d'une densité de type D1. Les coupes tomodensitométriques transversales montrent une hyperminéralisation médullaire diffuse de la région symphysaire (annexe 3). Les zones d'hyperminéralisation médullaire focale sont caractérisées par des densités osseuses importantes de 1406 HU, comparées aux valeurs moyennes de 944 HU à région anatomique équivalente [Turkyilnaz et coll., 2007] au sein d'un os médullaire de 742 HU chez le patient 37 (annexe 3).

Les examens scannographiques du patient 41 montrent à nouveau une hyper-minéralisation osseuse médullaire avec un os cortical compact, homogène et prédominant entourant une zone centrale trabéculaire réduite, ce qui correspond à un os de densité D1.

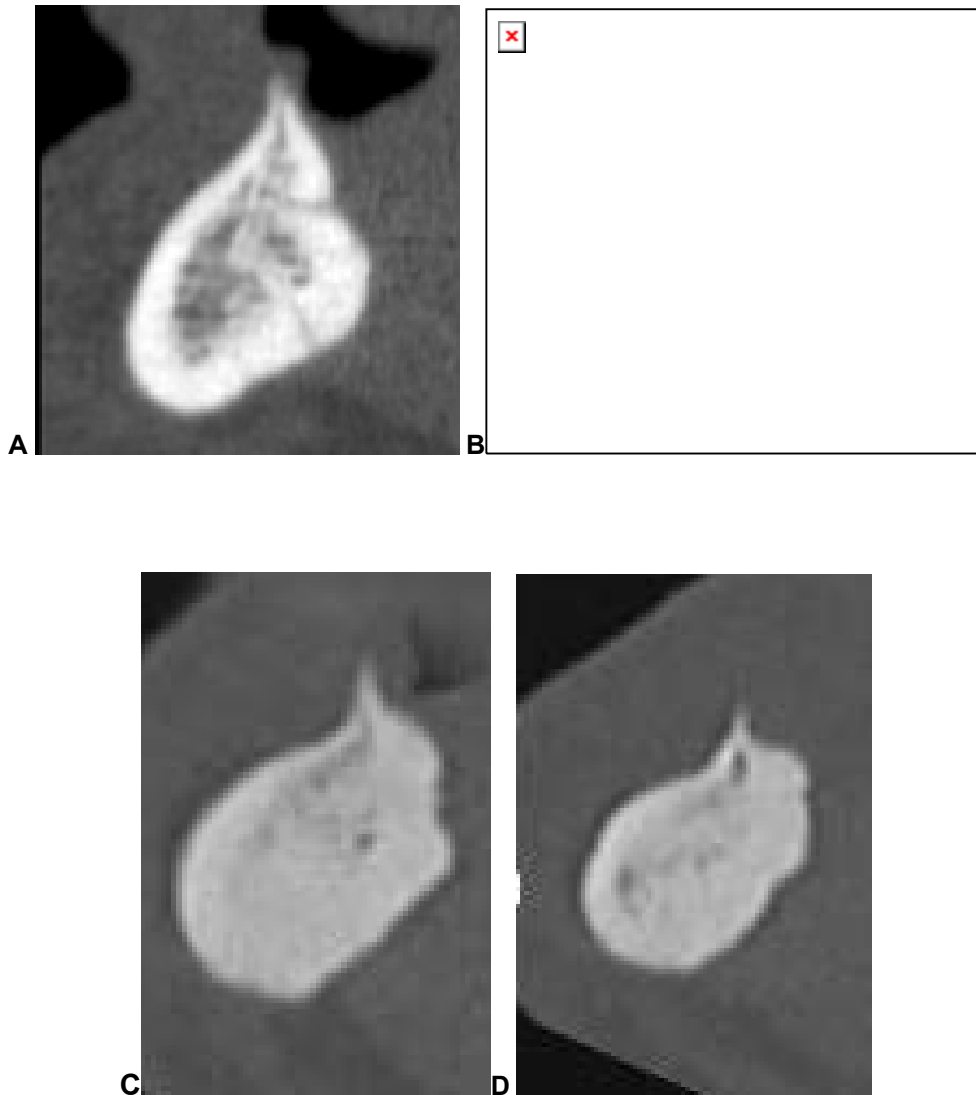
<b>Patient DEH</b>	<b>Densité corticale basale maxillaire (HU)</b>	<b>Densité corticale alvéolaire maxillaire (HU)</b>	<b>Densité corticale mandibulaire (HU)</b>
<b>Patient 17</b>	1037	1011	1125
<b>Patient 37</b>	1739	1507	1812
<b>Patient 38</b>	1617	1459	1811
<b>Patient 41</b>	1654	1542	N.D
<b>Patient 40</b>	1011	991	1390
<b>Moyenne</b>	1511	1379	1582
<b>Ecart-type</b>	320,5	248,1	396,3
<b>Valeurs contrôles (Park et coll., 2008)</b>	835-1113	810-940	1300-1560

**Tableau XVI** : Synthèse des résultats concernant les densités osseuses corticales maxillaires et mandibulaires chez 5 patients DEH.

La densité osseuse basale maxillaire est caractérisée chez trois patients DEH par des valeurs de densité osseuse supérieures aux données contrôles (835-1113 HU selon Park et coll., 2008) avec respectivement 1739 HU, 1617 HU et 1654 HU (Tableau XVI). Les analyses ont montré également des valeurs de densité osseuse basale maxillaire correspondant aux données contrôles (1011HU et 1037 HU) pour 2 patients DEH. La même variabilité est observée au niveau de l'os cortical mandibulaire, avec deux patients DEH caractérisés par une forte densité (1811 HU et 1812 HU), et deux patients présentant des densités osseuses dans les normes, avec néanmoins une moyenne de densité osseuse corticale mandibulaire supérieure aux normes (Tableau XVI).



**Fig 29** : Coupes scannographiques transversale (A), sagittale (B) et reconstructions tridimensionnelles en isosurface (C) chez le patient 14, montrant la forte densité médullaire (B) et une forte minéralisation dans l'espace inter-cortical (C) par rapport à ce qui est observé chez un patient contrôle (D). Le logiciel utilisé a été calibré selon des paramètres identiques pour l'analyse des examens scannographiques des patients DEX et contrôle.



**Fig 30** : Phénotypes osseux chez 2 patients adultes : densité osseuse D2, associée à une délétion de l'exon 2 du gène *EDA* (A : patient 17) et densité osseuse D1 en rapport avec une mutation faux-sens de l'exon 6 (B : patient 9). Phénotypes d'hyperminéralisation observés chez des jumeaux monozygotes atteints de DEH (patients 37 et 38 : C-D).

### 5.3 DISCUSSION

Par rapport aux contrôles, les patients DEX et DEH montrent des phénotypes osseux d'hyperminéralisation médullaire mandibulaire et d'hypercorticalisation de sévérité variable. Les patients DEX ont tous été caractérisés par des densités osseuses mandibulaires de type D1 et D2, alors que les patients contrôles présentaient majoritairement des densités mandibulaires de type D3 (Tableau XV).

La caractérisation de la densité osseuse mandibulaire selon la classification de Lekholm et Zarb, ainsi que les profils densitométriques et les reconstructions tri-dimensionnelles ont été complétés par des mesures de densité osseuse corticale mandibulaire et maxillaire. En les comparant avec des valeurs contrôles issues de la littérature [Park et coll., 2008], les analyses de densité osseuse ont montré une augmentation des densités corticales alvéolaires et basales, aussi bien maxillaire que mandibulaire, ainsi que des densités médullaires (Tableau XVI).

Des différences physiologiques de densité osseuse sont décrites chez les patients contrôles entre différentes régions. Les zones anatomiques classées par ordre décroissant de densité osseuse sont la région antérieure mandibulaire, la région antérieure maxillaire, la région postérieure mandibulaire et la région postérieure maxillaire [Norton et Gamble, 2001]. Ces différences ont également été retrouvées chez les patients DEX.

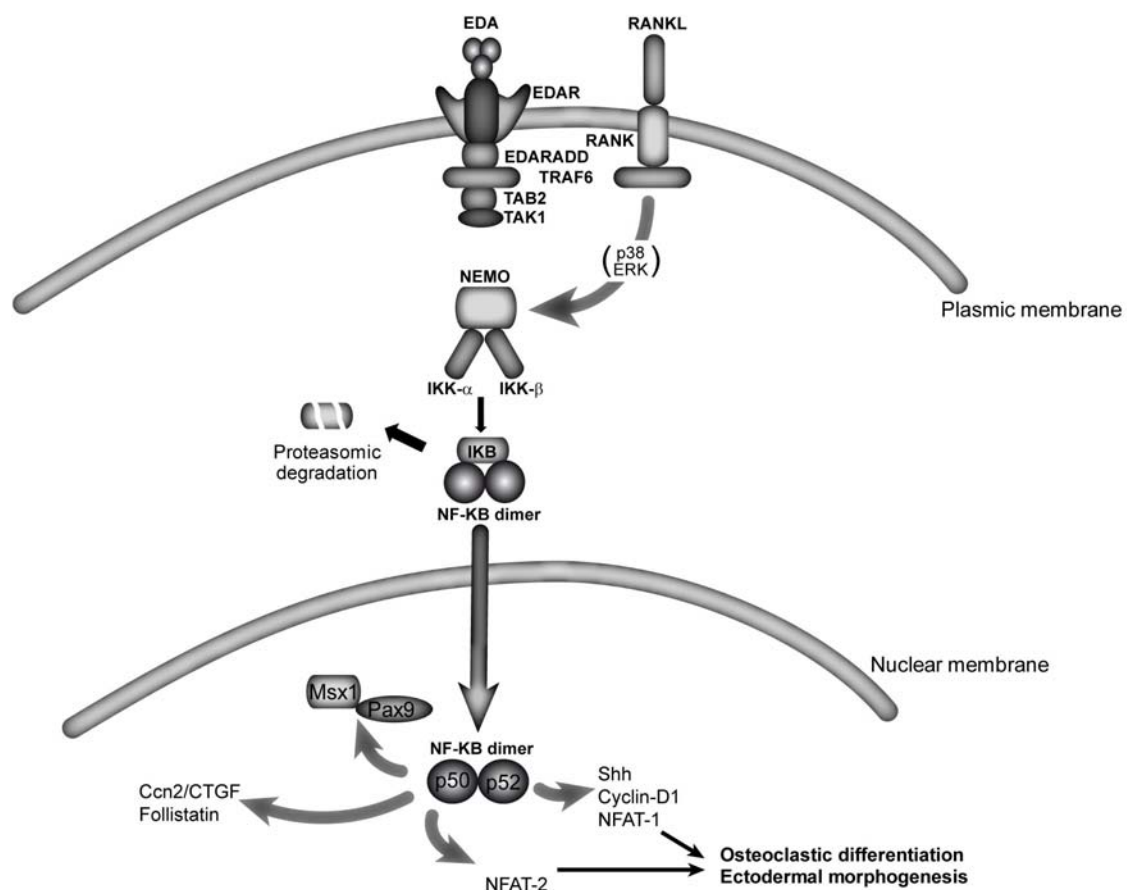
Des phénotypes dentaires sévères d'oligodontie en denture permanente sont associés à de fortes densités osseuses chez certains patients, alors que des densités osseuses dans les normes sont observées d'autres patients, présentant également une oligodontie. Ceci pourrait suggérer une certaine indépendance entre les phénotypes dentaire et osseux.

Une hyperminéralisation importante, avec des densités osseuses de type D1, est observée chez les patients présentant une altération moléculaire du site d'homologie TNF de l'EDA (patients 9 et 14). Les mutations du site TNF, inhibant l'interaction EDA-EDAR, et du site de clivage, semblent entraîner une altération de l'activation de NF- $\kappa$ B et des interactions EDA-RANKL (Fig 31) interférant avec les processus d'ostéoclastogenèse et d'activation ostéoclastique [Zhang et coll., 2001].

L'hyperminéralisation est plus modérée (densité de type D2-D3) chez les patients présentant une altération moléculaire du site de clivage protéolytique ou du site intra-cytoplasmique de l'EDA. La mise en évidence d'un éventuel effet différentiel des mutations du gène *EDA* sur le phénotype osseux nécessitera d'augmenter la cohorte des patients DEX pour chacune des mutations. La variabilité du phénotype osseux (Fig 30 A-B) pourrait être liée à la variabilité génétique de la DEX.

Des zones d'hyperminéralisation médullaire diffuses ou focales ont été également observées et caractérisées en fonction de leur densité (annexe 3). Une moyenne de 383 HU a été décrite au niveau de l'os médullaire mandibulaire contrôle [de Oliveira et coll., 2008], ce qui est inférieur aux valeurs de densité osseuse retrouvées chez les patients DEX. Les effets de la mutation *EDA* sur la structure osseuse semblent indépendants du phénotype dentaire. En effet, une hyperdensité osseuse médullaire et corticale est retrouvée aussi bien au niveau de l'os basal, que de l'os alvéolaire.

Une évolution de la densité osseuse est observée chez les patients DEX en fonction de l'âge. En effet, les densités osseuses plus faibles de type D2 sont retrouvées chez les patients DEX jeunes, alors que les densités osseuses plus importantes sont retrouvées chez les patients ayant fini leur croissance et les patients plus âgés. Ce phénomène ne correspond pas à une situation physiologique caractérisée par une régression linéaire au cours de l'âge des densités minérales osseuses [Chiu et coll., 2008].



**Fig 31** : Illustration des interactions moléculaires entre les voies de l'EDA et RANKL (adapté de Clauss et coll., in press).

Le phénotype osseux des patients DEH est à l'origine de difficultés lors du forage chirurgical, toutefois sans complication de l'ostéointégration implantaire à 18 mois post-opératoire.

En effet, les hyperdensités osseuses observées chez nos patients ont été à l'origine de la forte résistance de la corticale osseuse lors du forage chirurgical nécessaire à la mise en place des implants ostéointégrés (annexe 3). Les observations phénotypiques d'hyperminéralisation ont donc été confirmées lors de phase chirurgicale. Cette forte densité osseuse mandibulaire a nécessité une augmentation de la vitesse de forage chirurgical et du torque lors de l'insertion des implants. Une forte corrélation a été décrite entre la définition subjective de la qualité osseuse durant la phase chirurgicale et les paramètres osseux histomorphométriques [Norton et Gamble, 2001]. Des corrélations ont également été décrites entre la densité osseuse selon la classification de Lekholm et Zarb et les paramètres histomorphométriques osseux déterminés sur des biopsies osseuses [Norton et Gamble, 2001], montrant la pertinence de cette analyse de densité osseuse. La qualité et la quantité osseuses sont deux paramètres importants, pouvant influencer la technique chirurgicale, ainsi que la durée et les mécanismes biologiques de l'ostéointégration implantaire [de Oliveira et coll., 2008]. L'analyse fine pré-opératoire de la qualité osseuse est une étape importante dans la planification thérapeutique et présente un rôle pronostique concernant l'ostéointégration et la mise en fonction implanto-prothétique ultérieures (Norton et Gamble, 2001). De plus, l'épaisseur corticale, importante chez les patients DEX avec un phénotype d'hyperminéralisation, est un facteur intervenant également dans le pronostic implantaire et doit être considérée durant la phase pré-opératoire [Deguchi et coll., 2006]. Cette analyse phénotypique osseuse est donc, à plus forte raison, essentielle dans les traitements implantaires des patients DEX, des modifications structurales osseuses pouvant être liées à la mutation *EDA*.

L'ostéointégration fait l'objet d'un suivi clinique et radiographique longitudinal, afin de confirmer l'absence de complication pouvant être liée à l'hypotrophie osseuse ou à l'hyperminéralisation.

---

## **6. RECHERCHE EXPERIMENTALE SUR LE MODELE MURIN TABBY DE DEX**

---

Le modèle murin Tabby permet une étude des manifestations osseuses mandibulaires, sur le plan histologique, visant une meilleure compréhension des données d'imagerie obtenues chez les patients DEH.

Les principaux objectifs du volet expérimental de la thèse sont :

- L'étude des modifications morphologiques et structurales osseuses mandibulaires chez les souris Tabby après la naissance à 0,5 JPN.
- L'analyse morphométrique du centre de prolifération postérieure des incisives mandibulaires à 0,5 JPN et des relations entre phénotype dentaire et phénotype osseux.
- L'étude des modifications histologiques osseuses au niveau fémoral et mandibulaire chez les souris Tabby adultes. Les tissus osseux fémoraux ont été également analysés afin de détecter des modifications au niveau de structures squelettiques indépendantes du phénotype dentaire et à ossification enchondrale.

### **6.1 "INCISOR AND MANDIBULAR ALVEOLAR BONE PHENOTYPES IN THE TABBY MOUSE"**

#### ***ARTICLE EN PREPARATION***

Cet article a pour objet une description des modifications qualitatives et quantitatives de l'os alvéolaire mandibulaire de souris contrôles et Tabby (Ta) post-embryonnaires, basée sur une approche histomorphométrique. Nous avons cherché à déterminer si les modifications osseuses étaient liées aux modifications du développement dentaire. Pour cela, nous avons analysé la région incisive pour laquelle des modifications morphologiques osseuses avaient été initialement suggérées par micro-tomographie [Lesot et coll., 2004].



## **Matériel et méthodes**

Les analyses histomorphométriques ont consisté en la détermination du volume osseux mandibulaire alvéolaire et trabéculaire sur une zone d'intérêt de 500 µm localisée dans région antérieure mandibulaire. Des séries de coupes histologiques de têtes de 3 souris Ta post-embryonnaires (TA1, TA2 et TA3) (0,5 JPN) et de 2 souris Wild-type (C1 et C2) (0,5 JPN) ont fait l'objet d'analyses histomorphométriques osseuses réalisées à l'aide d'un logiciel d'analyses d'image appelé *ImageJ*. La densité osseuse trabéculaire, correspondant au ratio volume osseux trabéculaire/volume osseux alvéolaire a été également évaluée. La détermination de la surface de l'alvéole de l'incisive mandibulaire par contourage a été réalisée chez 1 souris Tabby et Wild-type à 5 et 10 JPN. L'ancrage radiculaire, correspondant au ratio entre la surface d'ancrage radiculaire des fibres desmodontales et la surface de l'alvéole a été également déterminée à 5 et 10 jours post-natal.

Le phénotypage des incisives mandibulaires a consisté en la détermination du diamètre mésio-distal et de la hauteur des germes d'incisives de souris Tabby et wild-type 0,5 jours post-natales sur une zone d'intérêt de 500 µm au niveau du centre de prolifération épithéliale postérieure.

### **Phénotype incisif mandibulaire des souris Tabby à 0,5 JPN**

Les analyses morphométriques des germes d'incisives mandibulaires Tabby à 0,5 JPN montrent une hypoplasie marquée avec une réduction du diamètre mésio-distal de 35,9%, alors que la hauteur moyenne des germes d'incisives mandibulaires Tabby présente une réduction de 34%. Ces données phénotypiques confirment les observations antérieures de Miard et coll. (1999), montrant une hypoplasie du compartiment épithélial des incisives au stade embryonnaire de bourgeon, ainsi qu'une réduction de la taille de l'organe de l'émail et de la papille dentaire au stade de capuchon.

Les analyses du volume de l'incisive mandibulaire dans la région d'intérêt ont montré une réduction moyenne de 49,8% chez les séries Tabby, correspondant à une hypotrophie marquée de l'incisive. A côté de l'hypotrophie, des anomalies morphologiques des germes d'incisives sont également observées, tout comme une rotation.

Des anomalies de l'ancrage radiculaire des incisives mandibulaires Tabby ont été caractérisées avec des réductions respectives de 40% et 50% du ratio « Surface d'ancrage radiculaire des fibres desmodontales/Surface de l'alvéole incisive » à 5 et 10 JPN.

### **Phénotype osseux alvéolaire associé aux souris Tabby**

En excluant le cartilage de Meckel dans la partie antérieure de la zone d'intérêt, nous observons une réduction statistiquement significative du volume osseux alvéolaire ( $p < 0,05$ ) pour les séries

Tabby TA2 (-29,5%) et TA3 (-16,6%) comparées à WT1 (moyenne de  $10,6 \cdot 10^4 \mu\text{m}^2$ ) et de l'ensemble des 3 séries Tabby (TA1 : -18,5%, TA2 : -40,6% et TA3 : -29,7%) comparées à WT2 ( $12,5 \cdot 10^4 \mu\text{m}^2$ ). Une réduction moyenne de 23,6% du volume osseux alvéolaire est observée chez les souris Tabby. Cette hypoplasie osseuse alvéolaire pourrait être liée à l'hypotrophie dentaire, en raison des interactions étroites entre ostéogenèse et odontogenèse. En effet, des variations parallèles du volume osseux alvéolaire et du volume des incisives ont été observées entre les 3 souris Ta et les 2 souris WT.

Afin de mieux évaluer les modifications de la structure osseuse, les analyses histomorphométriques du volume osseux trabéculaire permettent d'exclure le tissu mésenchymateux inter-trabéculaire et le cartilage de Meckel. Une réduction moyenne de 48,15% du volume osseux trabéculaire a été mise en évidence chez l'ensemble des souris Tabby analysées. Les séries Tabby présentaient un os trabéculaire mandibulaire dans la zone d'intérêt de volume moyen  $18,82 \cdot 10^6 \mu\text{m}^3$  comparées à un volume moyen de  $36,3 \cdot 10^6 \mu\text{m}^3$  pour les souris Wild-type à 0,5 JPN. Le volume osseux trabéculaire est caractérisé par une faible variabilité inter-individuelle entre les souris Tabby. La variabilité est plus importante au niveau du volume osseux alvéolaire et de la densité des trabéculations osseuses. Cette réduction du volume osseux trabéculaire pourrait donc correspondre à des anomalies structurales osseuses associées à la mutation *Ta/EDA* et indépendantes du phénotype dentaire. Des anomalies du remodelage osseux, en rapport avec une altération de la voie de signalisation *EDA/TA-TRAF6-NF- $\kappa$ B* impliquée dans la régulation de la résorption ostéoclastique pourrait être associée à la mutation *Ta*. En effet, des anomalies histologiques osseuses ont été décrites chez le modèle Tabby (Hill et coll., 2002] et chez les patients DEX sous forme d'hyperminéralisation médullaire [Clauss et coll., en préparation].

Le volume osseux relatif correspondant à la densité trabéculaire était de 63,2% pour les séries Wild-type et de 42,8% pour les souris Tabby, correspondant à une réduction globale de 20,4% de la densité trabéculaire chez les souris Tabby. Cette réduction était statistiquement significative à 0,5 JPN chez l'ensemble des souris Tabby ( $p < 0,05$ ), malgré une variabilité inter-individuelle plus importante. En effet, les densités osseuses des séries TA1, TA2 et TA3 étaient respectivement de 37,1%, 48,6% et 42,7%.

Les perspectives de ce travail sont une analyse des mécanismes moléculaires responsables des modifications de densité osseuse associées au syndrome Tabby. Ces analyses consisteront en la caractérisation histochimiques et immunohistochimiques de la fonction et du phénotype ostéoclastiques (Tartrate Resistant Alkaline Phosphatase) et ostéoblastiques (ostéopontine, ostéonectine, Bone Sialoprotein, Phosphatase Alcaline), ainsi que de la voie *NF- $\kappa$ B* (TRAF6).

Des analyses par micro-tomographie et des dosages de marqueurs métaboliques osseux (PTH, RANKL) compléteront cette étude.

### **Conclusions**

- Une réduction du volume osseux alvéolaire mandibulaire est observée chez les souris Tabby 0,5 JPN, correspondant à une hypotrophie osseuse en rapport avec l'hypotrophie incisive.
- Des modifications structurales osseuses se caractérisent par une réduction du volume osseux trabéculaire (48,1%) et de la densité des trabécules osseuse mandibulaires (20,4%) chez les souris Tabby 0,5 JPN. Elles sont indépendantes de l'effet de la mutation Ta sur l'incisive.
- Une variabilité inter-individuelle du volume osseux alvéolaire est observée, avec néanmoins une homogénéité de la structure osseuse illustrée par la faible variabilité inter-individuelle du volume osseux trabéculaire entre les souris Tabby.



## **6.2. ANALYSES HISTOLOGIQUES ET IMMUNOHISTOCHIMIQUES DE L'OS MANDIBULAIRE ET FÉMORAL DE SOURIS WILD-TYPE ET TA ADULTES : DONNEES COMPLEMENTAIRES**

Nos données phénotypiques provenant des patients DEX, ainsi que des observations cliniques issues de la phase chirurgicale implantaire, ont suggéré des modifications structurales osseuses associées à la mutation *EDA*. Par ailleurs, certaines observations chez la souris ont mis en évidence une expression des transcrits *EDA* mRNA au niveau de la mandibule et du cartilage de Meckel [Tucker et coll., 2000], ainsi que des modifications de densité osseuse trabéculaire au niveau du squelette post-axial de souris Tabby [Hill et coll., 2002]. Nous avons donc cherché à mettre en évidence des modifications osseuses chez les souris Ta adultes, par rapport aux souris WT, au niveau mandibulaire et fémoral. Pour cela, nous avons utilisé différentes approches complémentaires des analyses histomorphométriques décrites plus haut (article en préparation).

Plusieurs techniques de colorations histologiques ont été utilisées, dont le bleu-alcian-hématoxyline-éosine (coupes de mandibules à 0,5, 5 et 10 JPN), l'hématoxyline-éosine et le trichrome de Masson. Ces techniques apparaissent complémentaires pour l'étude des structures osseuses. En effet, la coloration hématoxyline-éosine constitue une étude préliminaire des constituants cellulaires osseux. La coloration au trichrome de Masson permet l'étude de visualiser les constituants collagéniques, marqués au bleu d'aniline, et des éléments cellulaires marqués à la Fuchsine acide et à l'hématoxyline de Groat.

Ces méthodes devraient permettre de visualiser des modifications au niveau des éléments cellulaires et matriciels osseux, ainsi que des changements au niveau de la densité, de l'épaisseur trabéculaire et des espaces inter-trabéculaires chez les souris Tabby.

### **6.2.1 Matériel et méthodes : histologie, immunohistologie et dosage ELISA de PTH**

#### **Lignée Tabby**

Les souris Tabby B6C-BACa-A<sup>ω-J</sup>/A-EDA<sup>ta</sup>/0 utilisées pour l'obtention de la lignée Tabby ont été obtenues de Jackson Laboratory [Bar Harbor, Maine, USA) et élevées au laboratoire de l'Académie des Sciences de Prague dans le laboratoire du Dr Peterkova [Peterkova et coll., 2002]. Les souris Tabby homo- et hémizygotés, ainsi que les souris contrôles Wild-type ont été obtenues par croisements successifs entre femelles Tabby homozygotés (Ta/Ta), hémizygotés (Ta/0) ou hétérozygotés (Ta/+) avec des mâles Tabby hémizygotés. Le génotype des souris Ta,

correspond à une mutation frameshift par délétion du nucléotide +550 de l'exon 1 du gène *Ta* [Srivastava et coll., 1997]. Le phénotype Tabby a été déterminé en fonction de critères morphologiques externes. Le phénotype dentaire a été analysé uniquement chez les femelles Tabby homozygotes ou hémizygotés et les mâles Tabby hémizygotés. Le phénotype des souris Tabby et Wild-type a été analysé pour des souris présentant le même stade de développement, le même âge chronologique et le même poids corporel.

Les souris contrôles (Wild-type : WT) ont été obtenues en croisant des animaux phénotypiquement normaux provenant du même stock. Les croisements ont été réalisés de nuit et le jour Embryonnaire (E) 0,0 correspond à la détection du bouchon vaginal. Les prélèvements ont été réalisés à 0,5, 5 et 10 JPN. L'ensemble des traitements et sacrifices des animaux est en accord avec les lois de protection des animaux de laboratoire.

## **Colorations histologiques et Immunolocalisation osseuse de l'ostéopontine**

### ***Préparation des coupes histologiques***

Les mandibules de souris Wild-type et Tabby adultes disséquées ont été rapidement fixées dans du Paraformaldéhyde 4%-PBS durant 48h, puis décalcifiées dans une solution d'EDTA 15%-PBS durant 15 jours. Les mandibules décalcifiées ont été déshydratées par un gradient d'éthanol-LMR, selon le protocole expérimental suivant :

- Déshydratation par 3 bains successifs d'éthanol 70%, 90% et 100% (24h pour chaque bain)
- Bain de 24h dans une solution de LMR
- Inclusion dans la paraffine liquide à 37°C
- Conservation des échantillons inclus à 4°C.

Les coupes histologiques sériées de mandibule de 7 µm d'épaisseur ont été réalisées sur un microtome Leica RM 2165 et stockées à 4°C en vue des colorations histologiques et des immunomarquages. Les coupes ont été collées sur des lames histologiques de type *Permafrost*.

### ***Coloration histologique hématoxyline-éosine***

Les coupes histologiques sont déparaffinées selon le protocole expérimental suivant de gradient décroissant LMR-éthanol :

- 2 bains successifs de 5 min dans du LMR
- 2 bains successifs de 5 min dans de l'éthanol 100%
- 2 bains successifs de 5 min dans de l'éthanol 95%
- 1 bain de 5 min dans de l'éthanol 70%
- Lavage dans de l'eau bi-distillée 5 minutes.

Après le déparaffinage :

- 2 bains successifs de 15 min dans des solutions d'hématoxyline 10 % puis d'éosine 10%
- Lavage avec de l'eau bi-distillée 5 min puis 2 lavages PBS
- Montage des coupes histologiques dans milieu de montage *Eukitt*.

### **Coloration histologique au trichrome de Masson**

La coloration au trichrome de Masson consiste en une succession d'un colorant nucléaire (hématoxyline de Groat), d'un colorant cytoplasmique (Fuchsine acide) et d'un colorant des tissus conjonctifs (bleu aniline marquant le collagène I). Elle permet un bon contraste pour l'analyse des structures collagéniques.

#### Le déparaffinage des coupes histologiques est suivi par :

- Bain de 5 min dans de l'hématoxyline de Groat
- Lavage à l'eau distillée 5 min
- Bain de 15 min dans de la Fuchsine Acide
- Lavage à l'eau distillée 5 min
- Bain de 15 min dans de l'Acide Phosphomolybdique
- Lavage à l'eau distillée 5 min
- Bain de 30 s dans du Bleu d'Aniline
- Déshydratation des coupes
- Montage sur milieu de montage *Eukitt*.

### **Immunodétection par immunofluorescence de l'ostéopontine**

Les coupes histologiques font l'objet dans un premier temps d'un déparaffinage selon le protocole expérimental déjà décrit.

Une saturation des sites de liaison aspécifiques des anticorps primaires est réalisée par incubation en chambre humide des coupes histologiques avec une solution de BSA (Bovine Serum Albumine) 1%-PBS (100 µl/lame). La phase de saturation est suivie par 3 lavages PBS durant 5 minutes. Des contrôles ont été effectués, suivant le même protocole en l'absence d'anticorps primaire.

### **Déminéralisation sur lame**

La phase de déminéralisation sur lame permet un démasquage antigénique des différentes protéines matricielles et membranaires ostéoblastiques et ostéoclastique. Elle est réalisée selon le protocole expérimental suivant :

- Incubation de 100 µl/lame d'EDTA 15% en chambre humide durant 1 min
- 3 lavages PBS 5 minutes.

La spécificité de l'anticorps primaire monoclonal anti-ostéopontine MAB 3057 utilisé, produit par le clone ZH2, a été validée dans la littérature [Farach-Carson et coll. 1992]. Cet anticorps est produit par le laboratoire Chemicon International, il s'agit d'une IgG monoclonale produite chez le rat et reconnaissant l'ostéopontine murine native, présente sous différents isoformes de poids moléculaires compris entre 50 et 80 kDa. Le mAb est utilisé à une dilution de 1/100 dans du PBS-1% BSA. Après une incubation over-night à 4°C, 3 lavages au PBS sont effectués et suivis par l'incubation de l'anticorps secondaire.

L'anticorps secondaire est un anti-rat couplé au fluorochrome Alexa émettant dans les longueurs d'onde rouge à 594 nm. La dilution optimale est de 1/500 dans PBS. Une centrifugation des anticorps secondaire est réalisée à 12000 tours/min durant 1 minute. Une incubation de 2 h en chambre humide à l'obscurité des anticorps secondaires à 200 µl/lame est suivie par 3 lavages au PBS durant 5 min, et montage dans un milieu *Dakocytomation Fluorescent Mounting Medium*. L'observation est réalisée sur un microscope à fluorescence Leica. Les prises de vue sont réalisées en parallèle en fluorescence et en microscopie à contraste de phase.

## **6.2.2 Résultats**

### ***Histologie des os longs des souris WT et Ta***

Une réduction de l'intensité de la coloration au bleu d'aniline est observée au niveau des coupes histologiques transversales des diaphyses et métaphyses fémorales de souris Ta adultes, par rapport aux souris Wild-type (Fig 34-35). La région métaphysaire présente des zones plus fortement marquées à l'hématoxyline et à la fuchsine acide chez les souris Ta (Fig 35), où l'on détecte également des variations locales de la coloration au bleu d'aniline dans la matrice osseuse, par rapport à ce que l'on observe chez les souris WT (Fig 35). Ces observations sont réalisées aussi bien au niveau de l'os fémoral périphérique, que des travées osseuses intramédullaires (Fig 35). A fort grossissement (X40), les coupes histologiques de diaphyses fémorales colorées à l'hématoxyline-éosine permettent de visualiser une augmentation de la densité des lacunes ostéocytaires chez les souris Ta, par rapport aux souris WT (Fig 33).

### ***Histologique des mandibules en cours d'ossification et de souris adultes***

Une réduction de la coloration matricielle osseuse au bleu d'aniline est observée au niveau des coupes de mandibules de souris Ta, par rapport aux souris WT (Fig 36-37). De larges plages fortement colorées à l'hématoxyline et à la fuchsine acide, correspondant à des zones riches en éléments cellulaires cytoplasmiques et nucléaires, sont uniquement observées sur les coupes histologiques Ta, alors qu'une plus forte homogénéité de la coloration matricielle osseuse au bleu d'aniline caractérise les coupes mandibulaires des souris Wild-type (Fig 36-37).



L'immunolocalisation de l'ostéopontine sur des coupes frontales de mandibules de souris WT et Ta adultes se caractérise par une distribution spécifique au niveau des travées osseuses (Fig 40-41), correspondant chacune à une phase de sécrétion matricielle ostéoblastique. Le marquage par immunofluorescence apparaît plus intense au niveau des coupes de mandibules de souris Ta par rapport aux souris WT (Fig 40-41). Des îlots intra-osseux exprimant l'ostéopontine sont plus nombreux au niveau des coupes de mandibules Ta (Fig 42). Le marquage périphérique, au niveau du périoste de l'os alvéolaire mandibulaire apparaît plus intense chez les souris Ta (Fig 40-42).

### 6.2.3 Discussion

Le gène *Ta*, présente une forte homologie de plus de 94% avec le gène *EDA*, muté dans la DEX chez l'homme [Srivastava et coll., 1997]. Néanmoins, le modèle murin est caractérisé par un fond génétique stable, ce qui l'oppose aux patients DEX. La souris Ta est caractérisée par une mutation frameshift par délétion d'un nucléotide de l'exon 1 du gène *Ta* [Srivastava et coll., 1997], ce qui ne reflète pas l'hétérogénéité génétique de la DEX chez l'homme. Cette particularité, associée à un fond génétique stable, explique vraisemblablement la moins forte variabilité d'expression phénotypique dentaire chez la souris Tabby. En effet, la variabilité de l'oligodontie observée chez les patients DEX, n'est pas retrouvée chez la souris Ta, caractérisée par la présence uniquement de deux morphotypes molaires postnataux [Kristenova et coll., 2002].

Sur le plan phénotypique, la souris Tabby, comme les patients DEX, présente des anomalies du développement des structures ectodermiques, avec une hypotrichose, une agénésie ou une dystrophie des glandes exocrines, des anomalies du nombre, de la taille, de la position et de la morphologie coronaire [Srivastava et coll., 1997 ; Miard et coll., 1999 ; Kristenova et coll., 2002 ; Boran et coll., 2005]. Un des intérêts du modèle Tabby est qu'il permet d'étudier le phénotype osseux, sur le plan histologique et immunohistochimique, ce qui n'est pas réalisable chez l'homme.

Il existe aussi des différences entre le modèle Tabby et les patients DEX, dans la mesure où les anomalies dentaires sont beaucoup plus discrètes chez la souris Ta que chez les patients DEX. Dans la mâchoire inférieure, l'absence d'incisive est observée dans 18% des cas, l'absence de molaire dans 12% chez les souris Tabby hétérozygotes et 52% chez les souris Tabby homozygotes et hémizygotés [Kristenova et coll., 2002 ; Lesot et coll., 2004].

Une différence majeure entre l'homme et les rongeurs vient de leur dentition et de l'utilisation qu'ils en font. La position des forces appliquées sur l'os de la mâchoire, ainsi que leur périodicité, sont très différentes dans les deux situations. Or, les forces appliquées interviennent dans le métabolisme osseux (synthèse et résorption) [Robling et coll., 2006]. Pour ces raisons, l'étude du phénotype osseux au niveau de l'os alvéolaire mandibulaire antérieur nécessite des précautions quant à l'interprétation des résultats.

#### *Aspects histologiques et immunohistologiques des tissus osseux fémoraux et mandibulaires Tabby*

Les réductions de l'intensité de la coloration matricielle osseuse au bleu d'aniline suggèrent une densité collagénique inférieure, de l'isoforme Collagène I, au niveau des structures osseuses fémorales et mandibulaires Tabby. Des modifications histologiques osseuses au niveau de vertèbres de souris Tabby colorées à l'hématoxyline-éosine ont montré des anomalies épiphysaires et sub-épiphysaires [Hill et coll., 2002]. Nous n'avons pas retrouvé les inclusions cartilagineuses intra-osseuses observées par Hill et coll., (2002). Les variations topographiques de la coloration matricielle (trichrome de Masson) suggère que la matrice extracellulaire osseuse chez la souris Ta puisse être plus hétérogène que chez la souris WT (Fig 36-37). Des approches d'immunohistochimie devront être réalisées pour analyser la localisation des différents types de collagène chez la souris Ta.

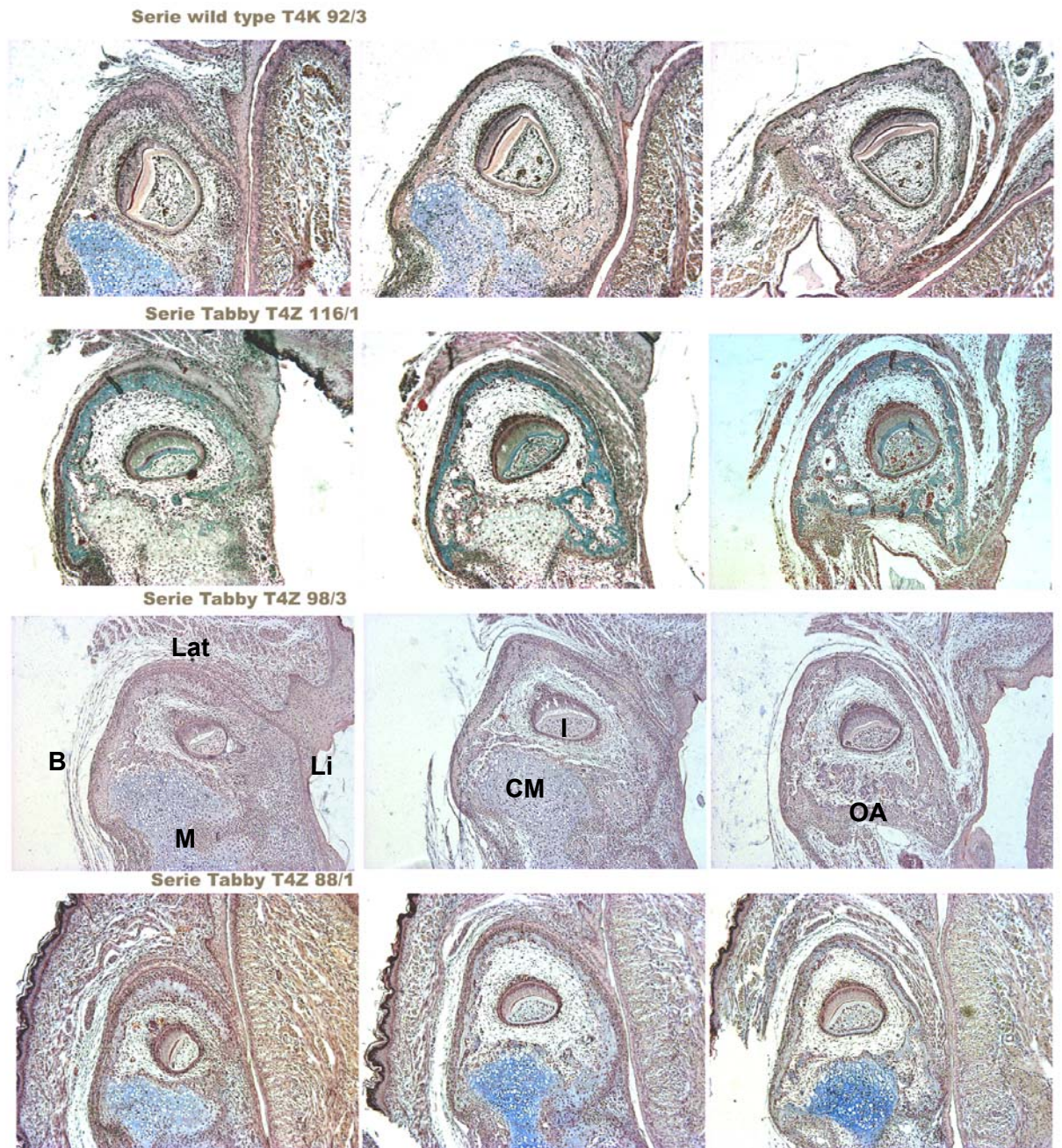
L'hypodensité en constituants collagéniques chez la souris Tabby semble associée à une augmentation de la densité en éléments cellulaires, ainsi qu'à une augmentation du marquage pour l'ostéopontine. Une analyse fine des modifications de la matrice extracellulaire, suggérées ici, devra être reprise par immunolocalisation. L'étude immunohistochimique de l'expression de marqueurs ostéoblastiques comme la BSP, l'ostéocalcine, Runx2/Osterix, la sclerostine (SOST) ou la phosphatase alcaline devrait permettre de confirmer ces résultats préliminaires [Bianco et coll., 1991 ; Ohta et coll., 1992 ; Ziolkowska et coll., 2006 ; Wiren et coll., 2008].

#### *Immunomarquage de l'ostéopontine (OPN)*

L'OPN est une protéine non collagénique de la matrice extracellulaire, présente sous différentes isoformes de poids moléculaire 50 à 80 kDa. Elle est abondante au niveau du tissu osseux et plus particulièrement de la phase minérale osseuse [Chen et coll., 1992]. L'ostéopontine est également une cytokine intervenant dans les processus de minéralisation, via ses sites de fixation au calcium, de résorption ostéoclastique et de remaniement osseux, via son site RGD [Ihara et coll., 2001 ; Franzen et coll., 2008]. L'ostéopontine est fortement impliquée dans le recrutement des ostéoclastes, en raison de ses interactions avec certaines intégrines ostéoclastiques, dont l'intégrine  $\alpha 5$ - $\beta 3$ , l'intégrine  $\alpha 5$ - $\beta 1$  et  $\alpha 5$ - $\beta 5$  [Horton et coll., 1995 ; Ihara et

coll., 2001]. L'ostéopontine active également les voies de signalisation participant à l'ostéoclastogenèse, dont RANKL, après l'adhésion des cellules ostéoclastiques [Ihara et coll., 2001]. De plus, l'ostéopontine joue également le rôle de médiation de l'activité anabolique osseuse de l'hormone parathyroïdienne (PTH), l'ostéopontine étant située en amont de la voie de signalisation RANKL-NF- $\kappa$ B [Ihara et coll., 2001]. En effet, une inhibition de la libération osseuse de calcium induite par la PTH est observée au niveau des cultures de tissu osseux provenant de souris OPN  $-/-$  [Ihara et coll., 2001]. L'augmentation du marquage à l'ostéopontine pourrait donc également suggérer l'existence d'activités de résorption ostéoclastique plus importantes chez les souris Tabby, ce qui serait en accord avec les résultats histomorphométriques montrant une réduction du volume osseux trabéculaire et de la densité osseuse.

Séries de coupes histologiques Wild-type et Tabby à 0,5 JPN

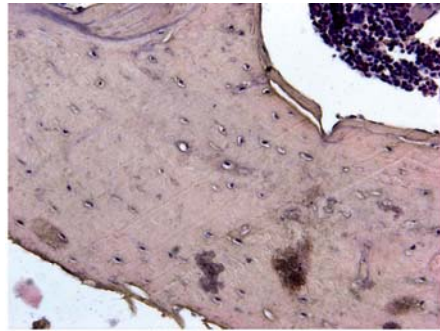


B : buccal, Li : lingual, M : médial, Lat : latéral, CM : cartilage de Meckel, I : Incisive, OA : Os alvéolaire 100  $\mu$ m : —

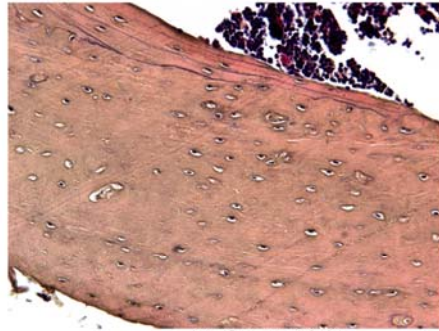
**Fig 32:** Coupes histologiques frontales des mandibules de souris Wild-type (T4K 92/3 : C1) et des 3 souris Tabby post-embryonnaires analysées (T4Z 116/1, T4Z 98/3 et T4Z 88/1 : TA1-TA2-TA3) dans les régions antérieures, médianes et postérieures de la zone anatomique d'intérêt.



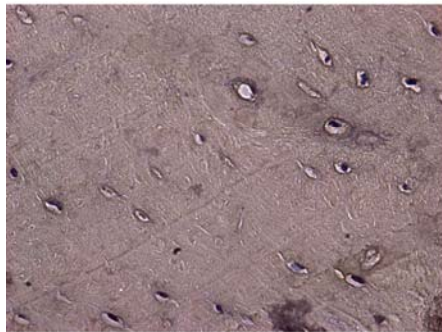
### Colorations histologiques à l'hématoxyline-éosine



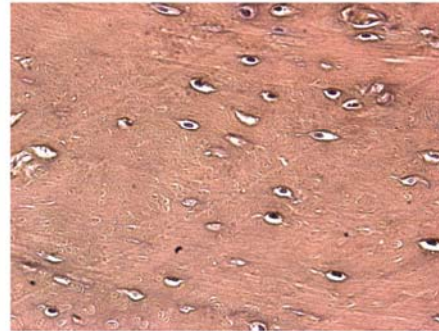
WT femur X20



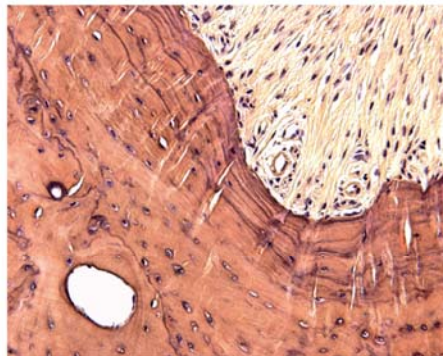
Ta femur X20



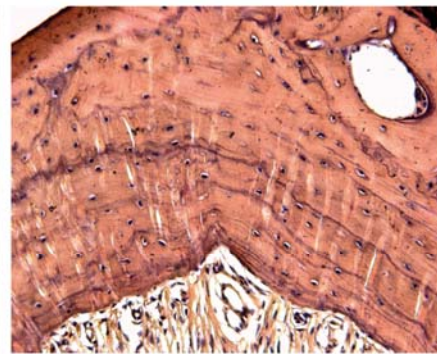
WT femur X40



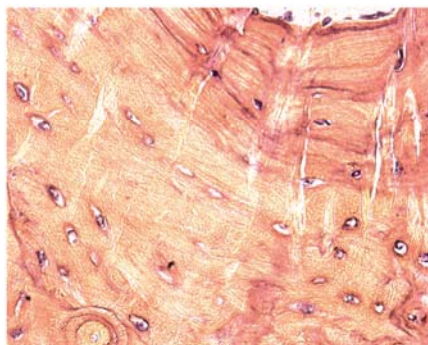
Ta femur X40



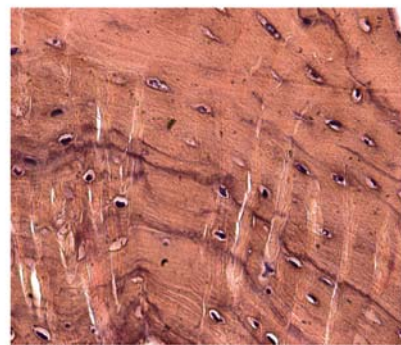
WT mandibule X20



Ta mandibule X20



WT mandibule X40

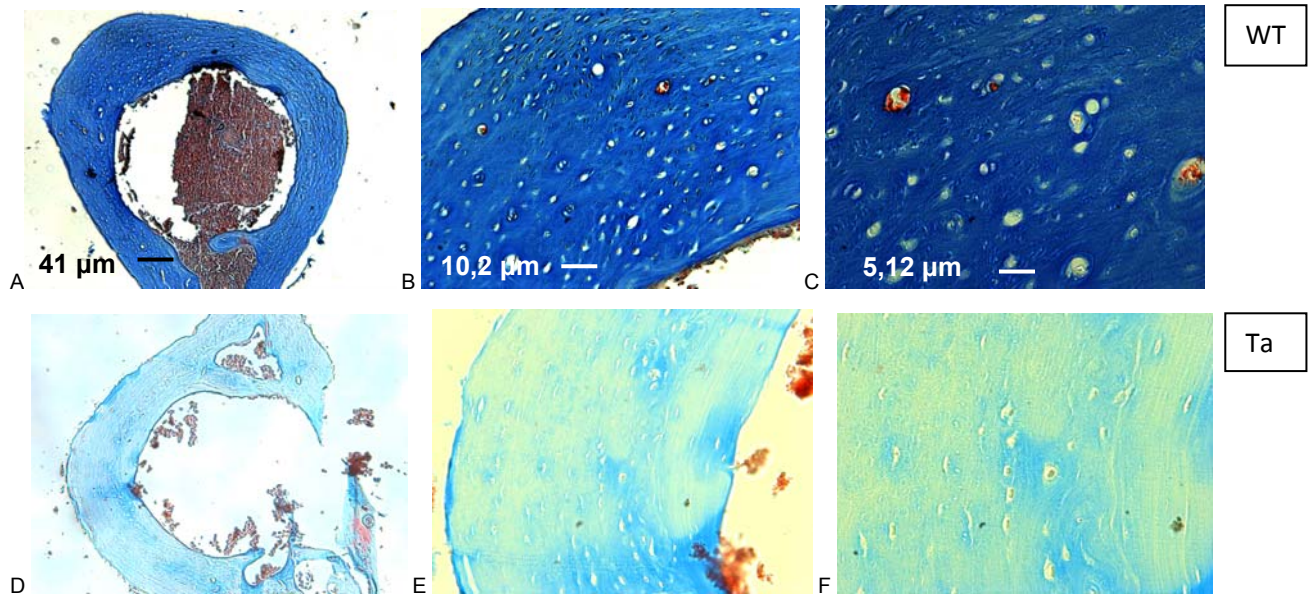


Ta mandibule X40

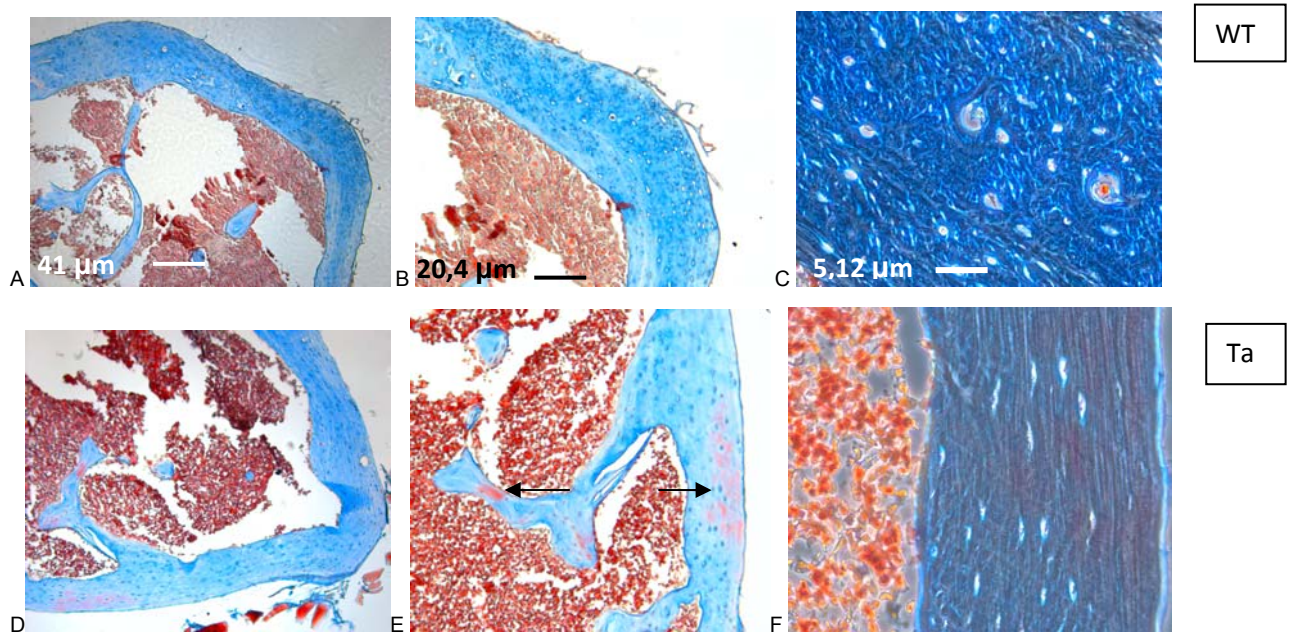
**Fig 33:** Colorations histologiques à l'hématoxyline-éosine de mandibules et de fémurs de souris WT et Ta adultes.



Colorations histologiques au trichrome de Masson de mandibules de souris WT et Ta adultes.

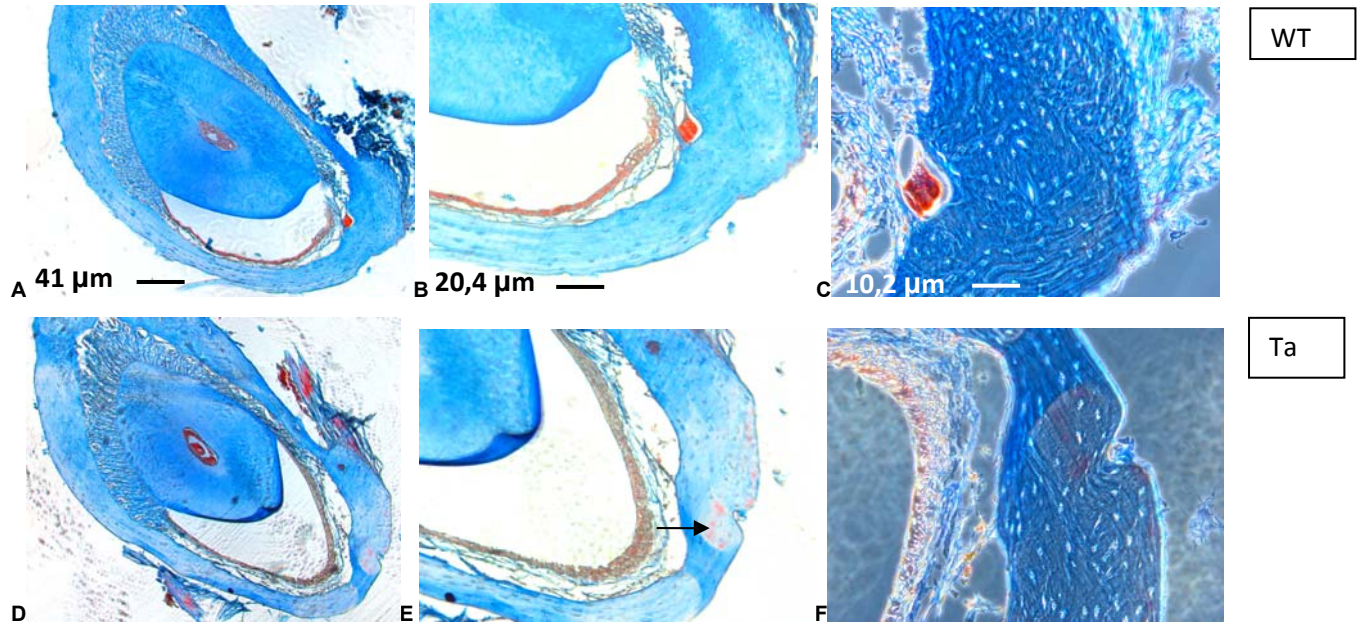


**Fig 34:** Coupes histologiques transversales de diaphyses fémorales de souris WT (a,b et c) et Tabby (d, e et f) visualisées à grossissement x5 (a-d), X20 (b-e) et X40 (c-f).

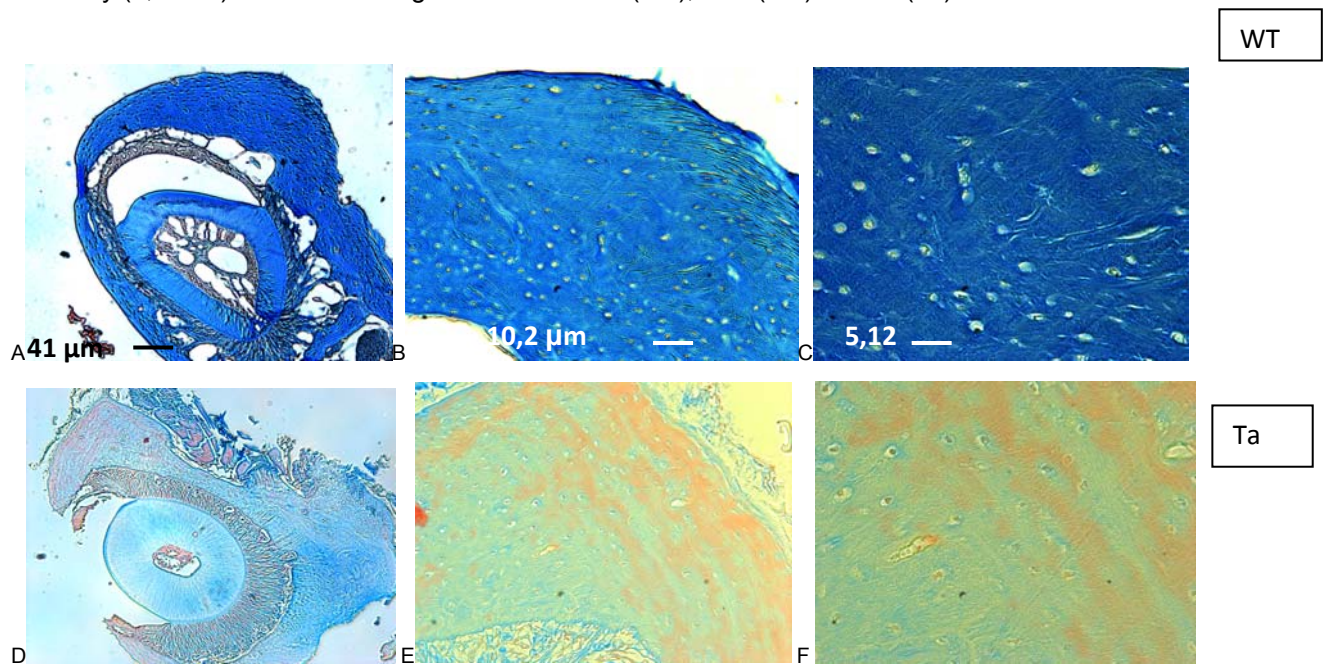


**Fig 35:** Coupes histologiques transversales de métaphyses fémorales de souris WT (a,b et c) et Tabby (d, e et f) visualisées à grossissement x5 (a-d), X10 (b-e) et X40 (c-f).



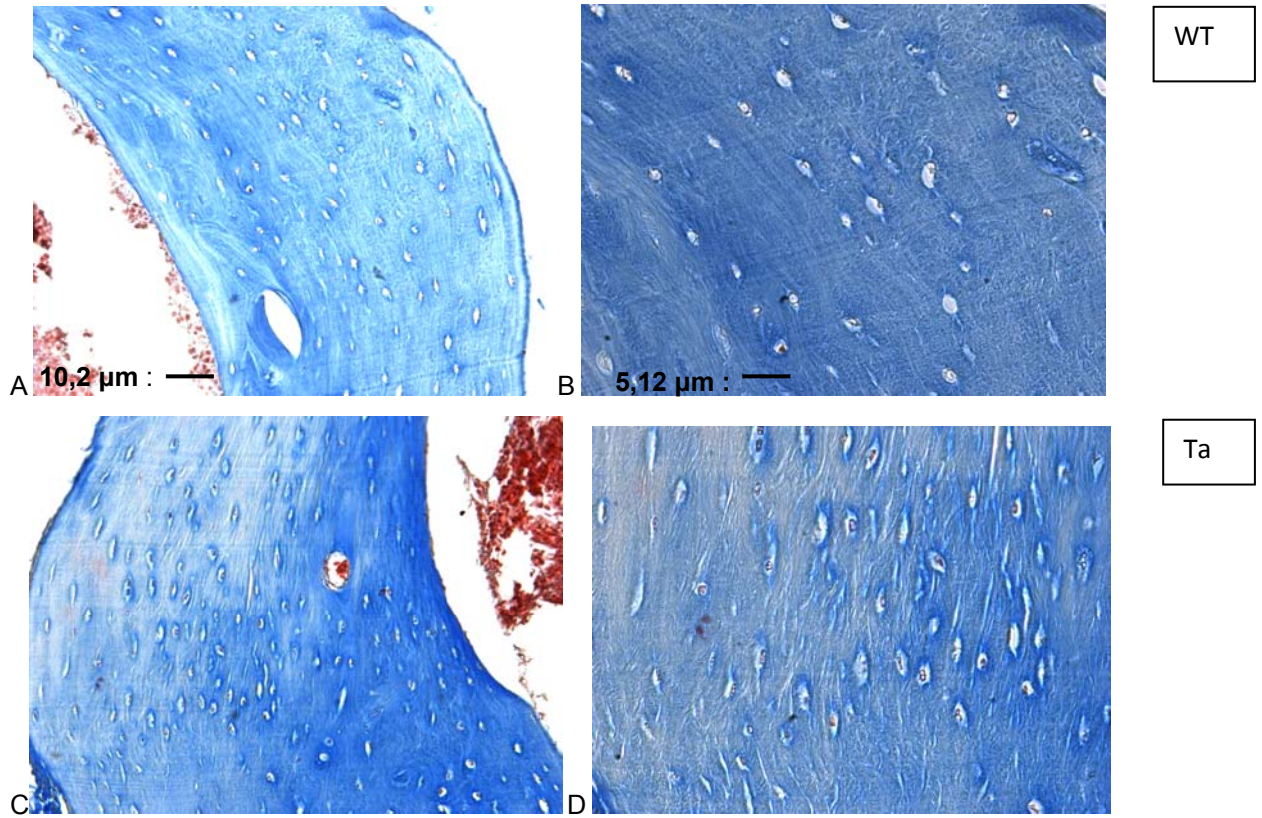


**Fig 36** : Coupes frontales colorées au trichrome de Masson de mandibules de souris adultes WT (a, b et c) et Tabby (d, e et f) visualisées au grossissement X5 (a-d), X10 (b-e) et X20 (c-f).

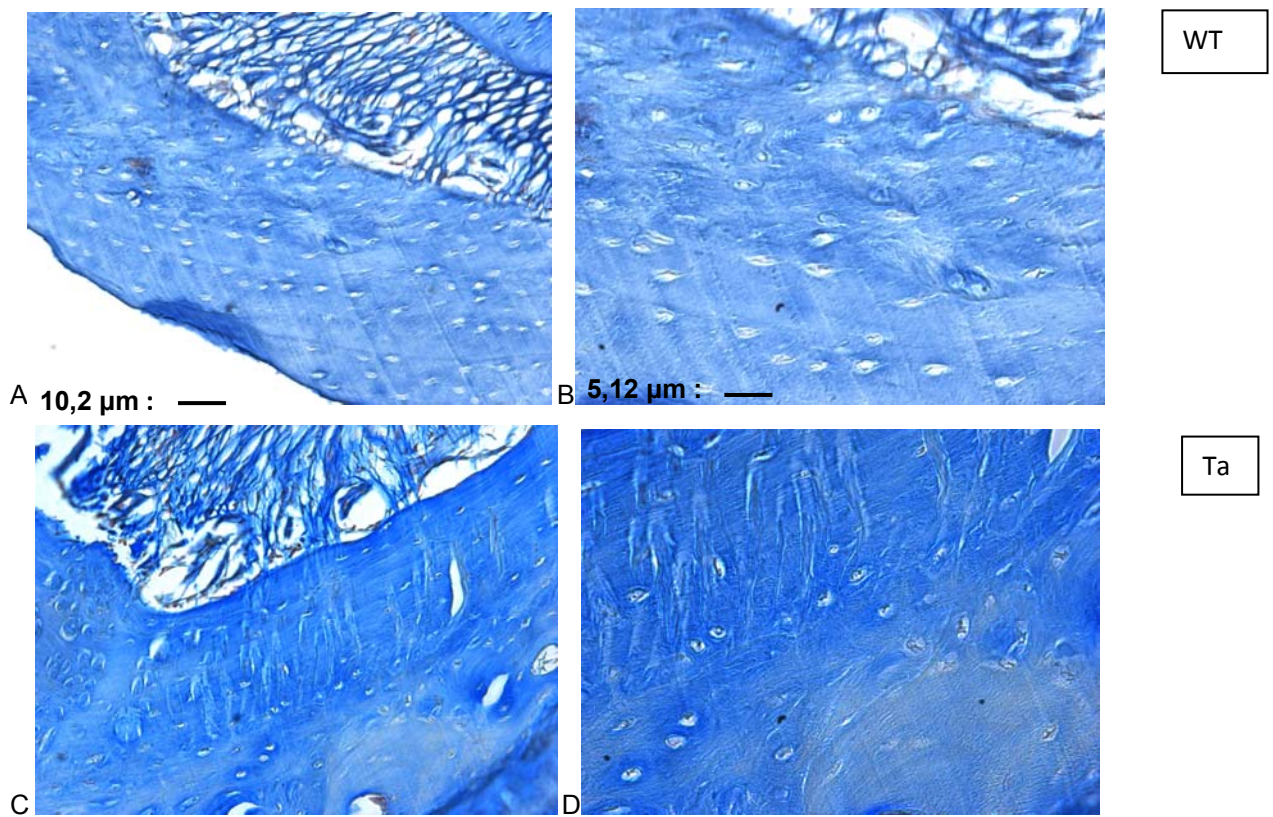


**Fig 37** : Coupes frontales colorées au trichrome de Masson de mandibules de souris adultes WT (a, b et c) et Tabby (d, e et f) visualisées au grossissement X5 (a-d), X20 (b-e) et X40 (c-f).





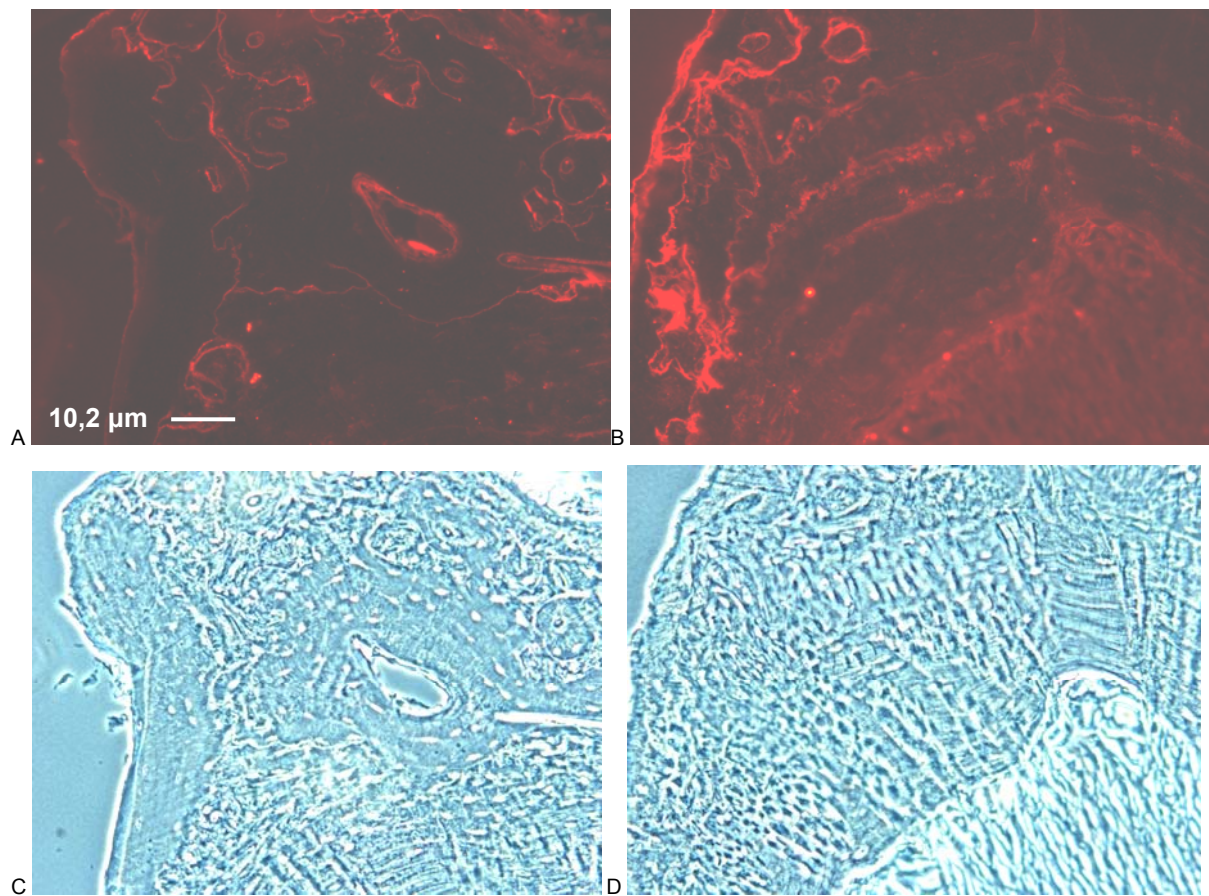
**Fig 38:** Coupes histologiques transversales de diaphyses fémorales de souris WT (a,b) et Tabby (c, d) et visualisées à grossissement x20 (a-c) et X40 (b-d).



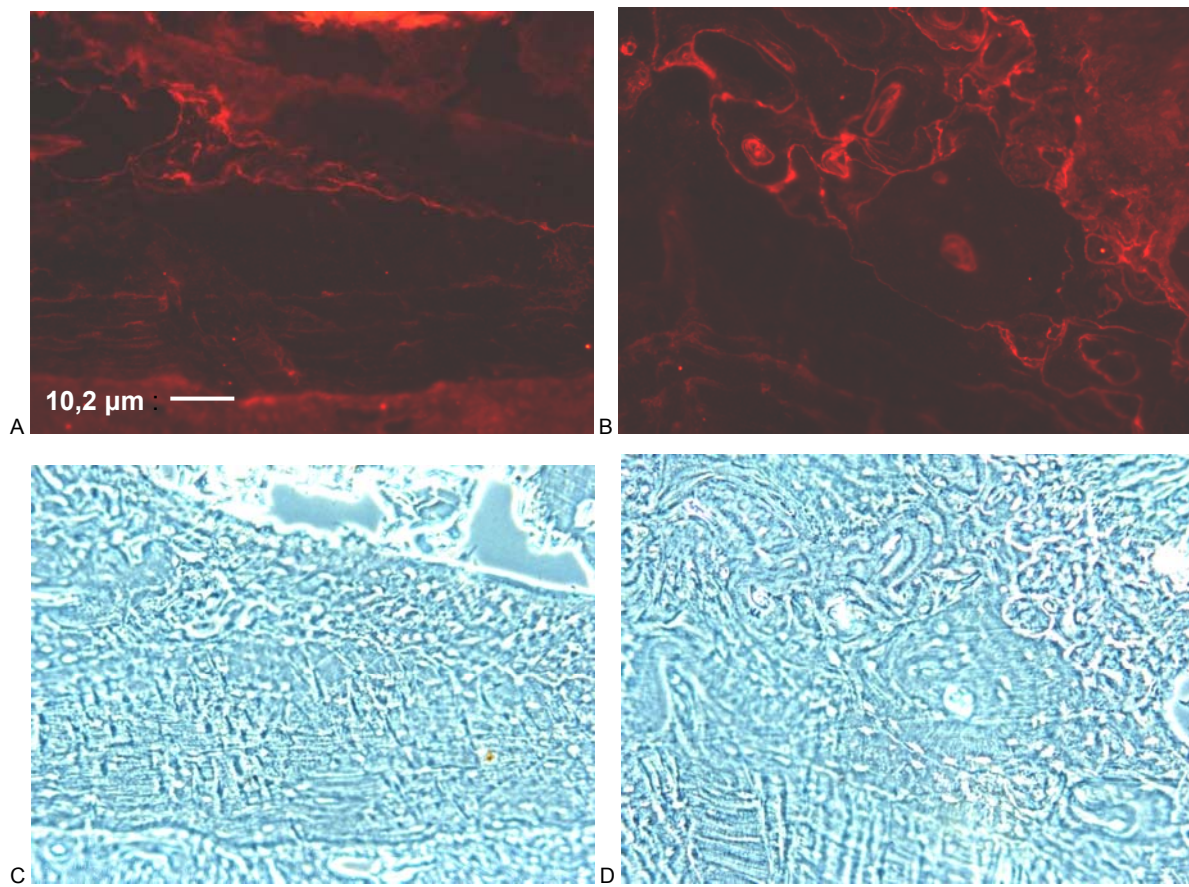
**Fig 39:** Coupes frontales colorées au trichrome de Masson de mandibules de souris adultes WT (a, b) et Tabby (c-d) visualisées au grossissement X20 (a-b) et X40 (b-d).



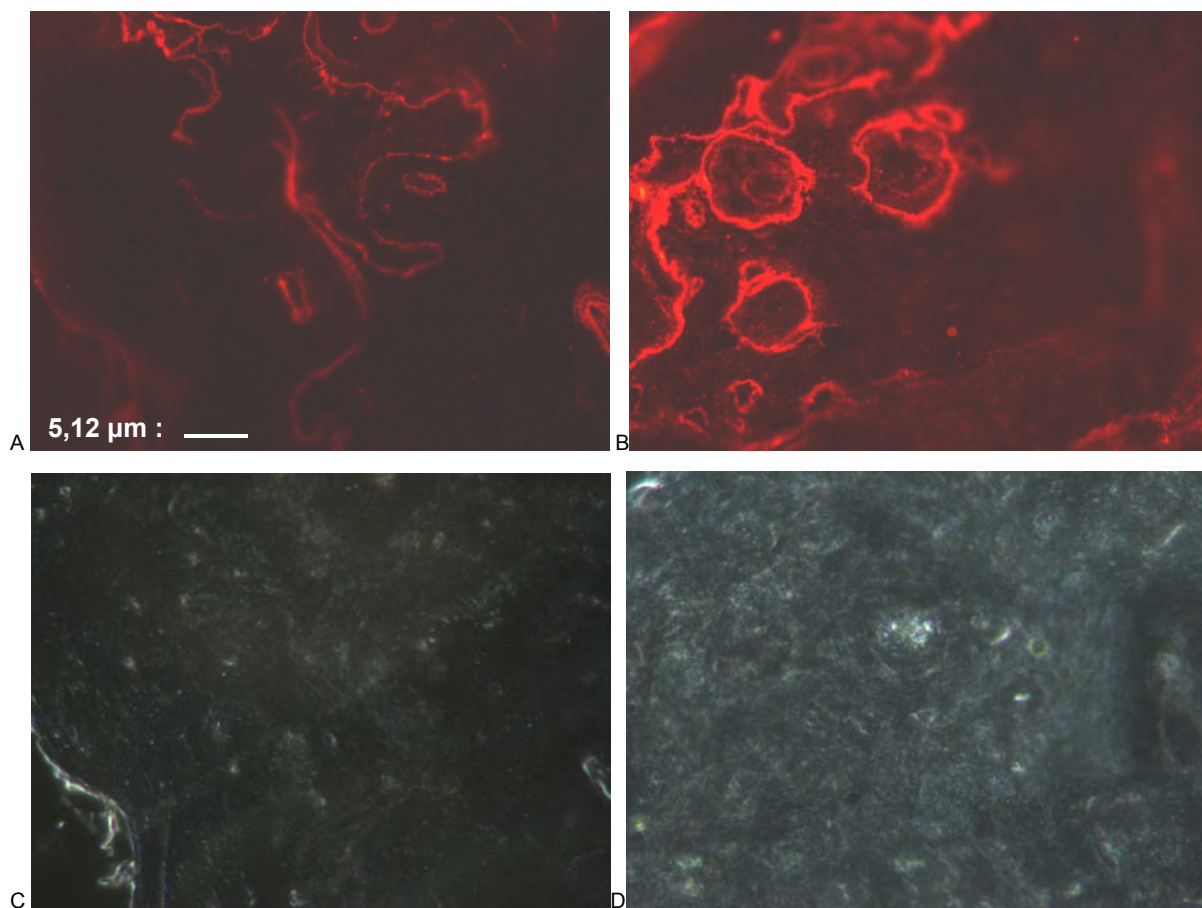
## IMMUNOLocalISATION PAR IMMUNOFLOUResCENCE DE L'OSTEOPONTINE (OPN)



**Fig 40:** Visualisation par immunofluorescence de l'ostéopontine au niveau de mandibules de souris Wild-type (a-c) et Tabby (b-d) avec immunofluorescence (a-b) et vue équivalentes en microscopie par contraste de phase (microscope Leica, oculaire X20).



**Fig 41** : Visualisation par immunofluorescence de l'ostéopontine au niveau de mandibules de souris Wild-type (a-c) et Tabby (b-d) avec immunofluorescence (a-b) et vue équivalentes en microscopie par contraste de phase (microscope Leica, oculaire X20).



**Fig 42:** Visualisation par immunofluorescence de l'ostéopontine au niveau de mandibules de souris Wild-type (a-c) et Tabby (b-d) avec immunofluorescence (a-b) et vue équivalentes en microscopie par contraste de phase (microscope Leica, oculaire X40).

## **CHAPITRE III**

### **DISCUSSION GENERALE**

Les phénotypes dentaire et osseux dans la DEX et la DEH autosomique chez l'homme seront confrontés aux observations chez la souris Tabby et discutés à la lumière des fonctions morphogénétiques de l'EDA.

#### **PHENOTYPE DENTAIRE ET CORRELATIONS GENOTYPE-PHENOTYPE**

L'étude du phénotype dentaire montre que l'oligodontie, sévère dans la majorité des cas, et systématiquement associée à des anomalies morphologiques des dents présentes, constitue un signe diagnostique essentiel dans la DEH. Bien que notre cohorte de patients atteints de DEX et de DEH autosomique récessive soit relativement importante, les différences phénotypiques restent difficiles à interpréter. La sévérité générale de l'oligodontie n'est pas significativement différente entre les groupes de mutations *EDA* et *EDAR*. En revanche, notre étude est la première à mettre en évidence une distribution différentielle des agénésies dentaires en denture temporaire entre la DEH autosomique récessive et la DEX. De plus, nous avons identifié une variabilité de l'oligodontie en fonction du gène muté (*EDA* ou *EDAR*), du type d'exon muté, du type de mutations ou du domaine fonctionnel de l'EDA-A1 touché par la mutation. Ces résultats sont en accord avec les données épidémiologiques déjà publiées [Vincent et coll., 2001 ; Lexner et coll., 2008]. La forte hétérogénéité génétique, caractérisée par une distribution des mutations sur tous les exons du gène *EDA* et la variabilité d'expression clinique de la DEX expliquent en partie la difficulté à établir des corrélations génotype-phénotype [Chassaing et coll., 2006 ; Van der Hout et coll., 2008]. Bien qu'il n'existe pas de corrélations génotype-phénotype claires, le diagnostic moléculaire reste un élément indispensable pour le conseil génétique, l'identification des femmes vectrices hétérozygotes et le diagnostic anténatal de la DEX.

La variabilité phénotypique chez les patients DEX se manifeste à l'échelle inter-familiale, intra-familiale, entre jumeaux monozygotes, voire chez un même individu, où il peut exister des asymétries de la dentition.

Une variabilité phénotypique inter-familiale correspond à des patients non apparentés et de même statut moléculaire présentant des oligodonties de sévérités différentes. Nous l'avons observé aussi bien en denture temporaire, qu'en denture permanente. Ces observations peuvent être la conséquence de facteurs épigénétiques spécifiques, dont la nature et les effets ne peuvent pas être appréhendés. Cet écueil, courant en clinique humaine, peut être évité dans les modèles murins où le fond génétique est mieux contrôlé [Townsend et coll., sous presse]. De plus, l'aboutissement de l'odontogenèse est multifactoriel et de nombreux gènes, autres que l'*EDA*, sont impliqués dans ce processus [Thomas et Sharpe, 1998 ; Cobourne et coll., 2003 ; Thesleff, 2006 ; Matalova et coll., 2008].

En effet, de nombreuses molécules de signalisation appartenant aux familles des TGF  $\beta$  (Bmp), Fgf, Tnf, Shh ou Wnt interviennent dans le contrôle de la morphogenèse, de

l'histogénèse, des cytodifférentiations et des interactions épithélio-mésenchymateuses, essentielles dans l'odontogénèse [Bei et Maas, 1998 ; Thesleff et coll., 2006]. Ces aspects illustrent la difficulté d'établir des corrélations génotype-phénotype, au sens strict.

Les gènes codant pour différents facteurs transcriptionnels, comme *p63* ou *Pitx2*, et les gènes homéotiques *Dlx1*, *Dlx2*, *Msx1*, *Barx1* ou *Alx3*, impliqués dans le code odontogène, jouent également un rôle important dans l'odontogénèse, à côté du gène *EDA* [Cobourne et coll., 2003 ; Thesleff et coll., 2006 ; Fleischmannova et coll., 2008]. L'importance de ces gènes homéotiques a été démontrée par un modèle murin *Dlx1/Dlx2* *-/-*, par exemple, caractérisé par une absence de développement des molaires maxillaires [Cobourne et coll., 2003].

Ces données moléculaires chez la souris n'ont pas d'équivalent chez l'homme, mais il est légitime de se demander si le développement dentaire au niveau maxillaire et mandibulaire n'est pas régulé par des mécanismes génétiques différents (Townsend et coll., sous presse).

Les gènes *Msx1* et *Pax9*, impliqués dans les oligodonties non-syndromiques, ont été également inactivés chez des modèles murins qui sont caractérisés par une interruption précoce de l'odontogénèse au stade de bourgeon dentaire, associée à des anomalies des structures squelettiques crânio-faciales [Berdal et coll., 2002; Fleischmannova et coll., 2008]. De même, les gènes mutés dans certaines oligodonties syndromiques chez l'homme, comme *Pitx2* (syndrome de Rieger) ou *p63* (Syndrome de Rapp-Hodgkin), conduisent à un arrêt de l'odontogénèse au stade de bourgeon ou de placode lorsqu'ils sont inactivés chez des souris knock-out *Pitx2* *-/-* et *p63* *-/-* [Fleischmannova et coll., 2008].

La variabilité phénotypique dentaire existe aussi au niveau intra-familial [Clauss et coll., sous presse ; Townsend et coll., sous presse]. L'existence de gènes modificateurs, en interaction avec le gène *EDA*, pourrait expliquer la variabilité phénotypique entre individus d'une même fratrie. En effet, l'effet des gènes modificateurs a été caractérisé dans d'autres pathologies génétiques comme la mucoviscidose ou l'hémochromatose héréditaire, à l'origine d'une variabilité d'expression clinique au sein d'une même famille [Labrune, 2002].

Des tableaux cliniques différents ont également été observés chez des jumeaux monozygotes atteints de DEX, renforçant cette notion de variabilité phénotypique intra-familiale [Townsend et coll., sous presse]. Ici encore, des facteurs épigénétiques, comme l'acétylation ou la méthylation de l'ADN, des variations locales des interactions cellule-cellule ou cellule-matrice et la prolifération cellulaire différentielle des cellules odontogènes, peuvent intervenir, tout comme les gènes modificateurs [Townsend et coll., sous presse].

Les asymétries de développement dentaire, observées dans notre étude chez des patients DEX, ainsi que chez la souris *Ta* au niveau de la région molaire [Kristenova et coll., 2002] et



incisive [Lesot et coll., 2004], soulèvent la question des mécanismes moléculaires impliqués. En effet, 23% des souris *Ta* homo- et hémizygotés sont caractérisés par une asymétrie de morphotype molaire, avec une hémi-mandibule de morphotype I et une hémi-mandibule de morphotype II [Kristenova et coll., 2002]. Au niveau de la région incisive, 15% des souris *Ta* présentent une absence unilatérale d'incisive mandibulaire [Lesot et coll., 2004]. Les asymétries de développement dentaire sont également retrouvées dans d'autres situations physiologiques ou pathologiques, comme les fentes labio-palatines [Lai et coll., 2008].

Une variabilité d'expression phénotypique a été également retrouvée entre des familles porteuses d'une mutation du même résidu de l'EDA-A1, et caractérisées par un phénotype dentaire soit modéré soit sévère. Lorsqu'il existe un phénotype dentaire modéré, celui-ci est associé à des manifestations également discrètes au niveau des autres structures ectodermiques, avec un fonctionnement sudoral normal et une absence d'hypotrichose. La mutation à l'origine de ce phénotype modéré est vraisemblablement plus conservatrice au niveau de la structure quaternaire de l'isoforme EDA-A1 et donc conduit à moins de perturbations de l'interaction entre le domaine d'homologie TNF trimérique et le récepteur EDAR.

#### **PHENOTYPE OSSEUX**

Des modifications morphologiques et structurales (densité osseuse) constituent un autre aspect du phénotype de la DEX. Elles peuvent être liées notamment aux altérations des fonctions moléculaires de la voie EDA-NF- $\kappa$ B dans la résorption osseuse ostéoclastique et l'ostéogenèse. En effet, les transcrits du gène *Ta* étant détectés au niveau de l'os mandibulaire en formation et du cartilage de Meckel, la mutation de ce gène pourrait entraîner des anomalies du développement mandibulaire [Tucker et coll., 2000].

Les modifications morphologiques alvéolaires mandibulaires décrites chez la souris *Tabby* post-embryonnaire correspondent à une hypoplasie osseuse en relation avec l'hypoplasie incisive [Lesot et coll., 2004 ; Clauss et coll., article en préparation]. En revanche, les modifications structurales osseuses semblent indépendantes du phénotype dentaire. Elles pourraient être liées à des anomalies de l'activité des ostéoblastes au cours du développement. L'expression de l'EDA au niveau des ostéoblastes a été mise en évidence dans le cas du crâne et des côtes durant la phase de sécrétion matricielle, mais également au niveau de la mandibule [Montonen et coll., 1998 ; Tucker et coll., 2000]. Nous avons observé des modifications de la matrice osseuse chez les souris *Ta* adultes au niveau de l'os mandibulaire et fémoral [Clauss et coll., article en préparation].

Des anomalies des fonctions ostéoclastiques pourraient intervenir durant le développement postnatal, en raison d'interactions fonctionnelles entre la famille TNF (dont l'EDA fait partie)

et la voie RANKL-NF- $\kappa$ B, essentielle dans l'ostéoclastogenèse, via TRAF6 et le facteur NF- $\kappa$ B [Zhang et coll., 2001].

Le phénotype osseux observé dans la DEX chez l'homme pourrait correspondre à une altération locale du remodelage osseux et de la résorption ostéoclastique, liée notamment à un dysfonctionnement de la voie NF- $\kappa$ B [Zhang et coll., 2001]. Les mêmes molécules d'adaptation intra-cellulaire TAB2, TAK1 et TRAF6 sont impliquées dans les voies de signalisation de l'EDA et de RANKL, suggérant l'existence d'éventuelles interactions entre ces deux voies [Naito et coll., 1999 ; Zhang et coll., 2001 ; Sinha et coll., 2002].

Chez la souris Ta, l'hypodensité osseuse mandibulaire observée après la naissance semble en contradiction avec l'hyperdensité osseuse observée à l'âge adulte qui se traduit par l'augmentation du nombre des trabéculations osseuses tibiales et par la diminution de l'espacement inter-trabéculaire [Hill et coll., 2002]. Ce phénomène existe également chez les patients DEX adultes [Clauss et coll., sous presse]. Différents paramètres peuvent expliquer le contraste entre ces observations. Les os longs et la mandibule résultent de mécanismes d'ossification différents, respectivement une ossification enchondrale et une ossification mixte endochondrale et membranaire [Ramaesh et Bard, 2003]. Par ailleurs, deux phases distinctes pré- et postnatales ont été décrites dans l'altération de la croissance de l'incisive chez la souris Ta [Lesot et coll., 2004]. En effet, durant le développement embryonnaire, un défaut de la croissance postérieure de l'incisive est observé dès le stade de bourgeon dentaire et affecte l'ensemble des souris Ta. En phase postnatale, des malformations du centre de prolifération postérieur de l'organe de l'émail viennent se sur-ajoutées. Par contre, elles ne sont observées que chez 18% des mutants [Lesot et coll., 2004]. Un phénomène bi-phasique analogue pourrait être impliqué dans l'ossification mandibulaire des souris Ta.

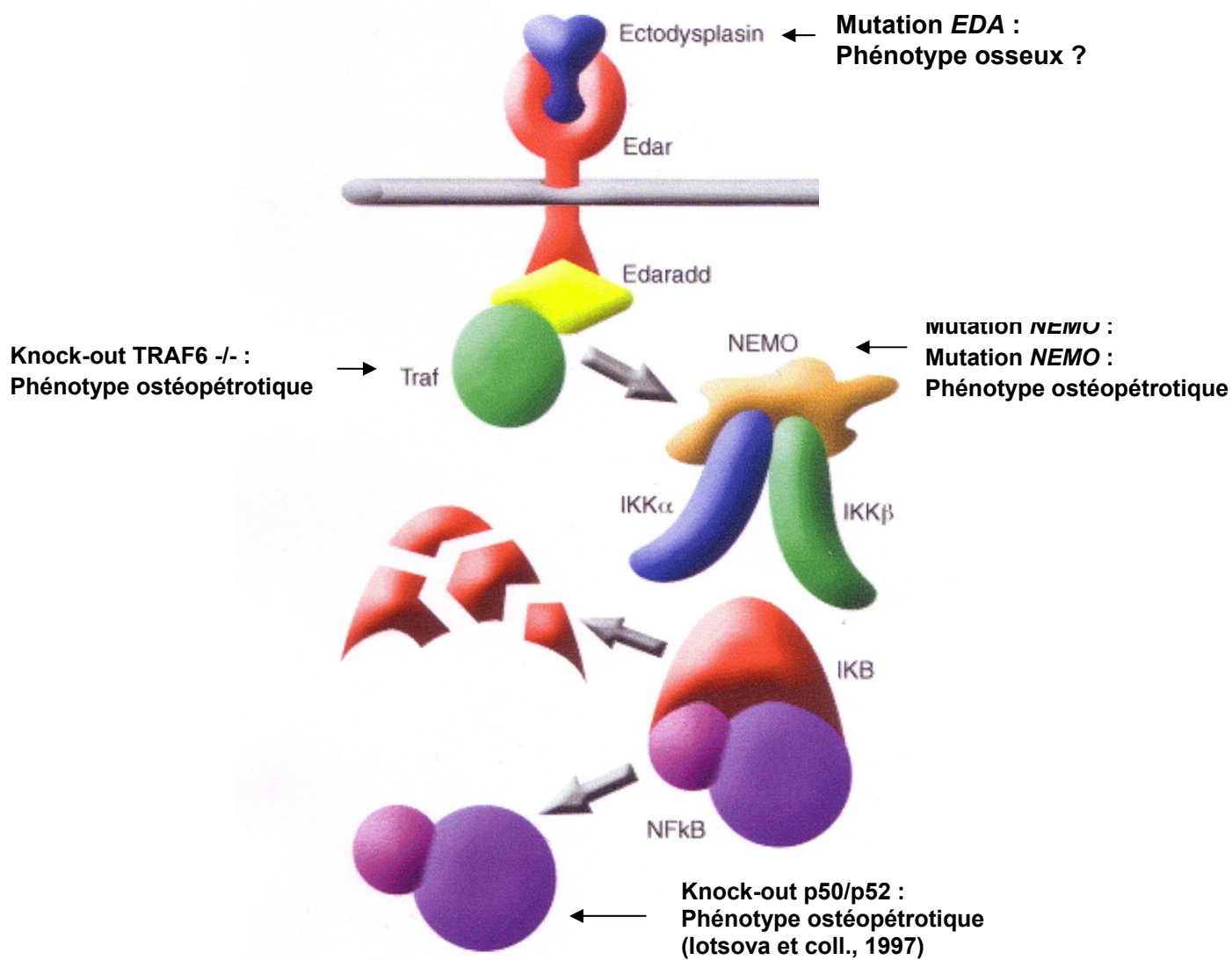
L'hyperdensité osseuse observée chez les souris Tabby adultes [Hill et coll., 2002] peut être liée à un phénotype mis en place durant la croissance postnatale en rapport avec une anomalie de l'ostéoclastogenèse et de l'activité ostéoclastique.

Les anomalies métaboliques osseuses pourraient également faire intervenir des facteurs endocriniens [Soderholm et Kaitila., 1985]. En effet, les transcrits du gène *EDA* ont été détectés au niveau de l'adénohypophyse durant le développement embryonnaire humain, ce qui serait à l'origine d'une dyshistogenèse et d'anomalies fonctionnelles adénohypophysaires [Mikkola et coll., 1999]. L'adénohypophyse sécrète notamment l'hormone adrénocorticotrope (ACTH), stimulant la sécrétion surrénalienne de glucocorticoïdes, qui interviennent dans le métabolisme osseux [Tauchmanova et coll., 2007]. En effet, les glucocorticoïdes entraînant une stimulation de la résorption ostéoclastique et une inhibition de l'apposition osseuse [Chiodini et coll., 2008], ces mécanismes pourraient être perturbés par une dysfonction adénohypophysaire liée à la mutation *EDA* [Mikkola et coll., 1999].



Ce phénotype osseux associé à la mutation *Ta* a été retrouvé dans l'étude clinique chez les patients DEX en cours de croissance et adultes, qui présentent des altérations osseuses mandibulaires morphologiques et structurales, des dysmorphies crânio-faciales ainsi qu'une hyperdensité osseuse [Clauss et coll., sous presse; Clauss et coll., article en préparation]. Les variations topographiques de densité des éléments cellulaires et matriciels osseux, chez la souris Tabby adulte, pourraient correspondre aux variations locales de la densité osseuse mandibulaire et aux hyperminéralisations médullaires focales observées chez les patients DEX.

Une altération en aval de la signalisation NF- $\kappa$ B peut conduire à un phénotype ostéopétrotique. En effet, une forme de DEH avec ostéopétrose est causée par une mutation hypomorphique du gène *NEMO* (NF- $\kappa$ B Essential Modulator) [Dupuis-Girod et coll., 2002]. Cette ostéopétrose modérée de type II est définie par une hématopoïèse extra-médullaire avec persistance de cavités médullaires. Le cortex osseux de ces patients est dense avec une ostéosclérose médullaire diffuse, notamment au niveau de la voûte crânienne [Dupuis-Girod et coll., 2002]. Ce phénotype illustre bien le rôle du facteur NEMO dans les mécanismes de remodelage osseux. Une inactivation du facteur d'adaptation cytoplasmique TRAF6, chez le modèle murin knock-out TRAF6 *-/-*, est également associée à un phénotype ostéopétrotique, avec des anomalies du remodelage osseux et des fonctions ostéoclastiques. Ce phénotype montre qu'une altération plus en amont de la voie de signalisation NF- $\kappa$ B est également responsable d'anomalies de l'homéostasie osseuse [Naito et coll., 1999 ; Lomaga et coll., 1999].



**Fig 43:** Voie de signalisation EDA-NF-κB avec phénotypes ostéopérotiques associés aux mutations ou inactivations de différents de ses composants (adapté de Courtney et coll., 2005).

## CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

L'originalité de notre travail réside dans la prise en compte des phénotypes dentaires et osseux chez les patients atteints de dysplasie ectodermique hypohidrotique et la souris Tabby. Ces comparaisons posent toutefois un certain nombre de questions. Le modèle Ta nous a permis l'étude du phénotype osseux au niveau histologique et cellulaire. Cependant, l'os mandibulaire chez la souris Tabby présente certaines spécificités. Les contraintes mécaniques exercées sur cet os ont un effet au niveau des cellules ostéoblastiques et ostéoclastiques et sont très différentes de ce qui peut se passer chez l'homme [Robling et coll., 2006]. En effet, les forces exercées sur l'os mandibulaire des rongeurs entraînent des modifications de l'architecture trabéculaire osseuse, ainsi qu'une stimulation de la prolifération et de l'apposition cellulaire ostéoblastique [Grimston et coll., 2006 ; Harris et coll., 2007]. Les contraintes mécaniques cycliques ont un effet anabolique osseux avec la stimulation de la prolifération et de l'apposition ostéoblastique chez la souris, via différents facteurs locaux comme l'Insuline Growth Factor (IGF-1) [Tokimasa et coll., 2003]. De plus, IGF-1 entraîne également une augmentation des cellules ostéoclastiques TRAP+ par unité de surface, démontrant le rôle des contraintes mécaniques sur les processus de remodelage osseux [Tokimasa et coll., 2003].

L'étude du phénotype dentaire a montré une distribution différentielle des agénésies entre les mutations *EDA* et *EDAR*. La forte variabilité d'expression dans les différents groupes de mutations pose la question des conséquences phénotypiques liées aux différentes altérations structurales du complexe EDA-A1-EDAR. Nous étudierons les effets des altérations de la structure quaternaire du complexe EDA-A1-EDAR pour des patients à phénotype donné et à génotypes différents [Li et coll., 2008]. L'analyse structurale par modélisation d'homologie de l'EDA-A1 mutée à partir des données cristallographiques de l'EDA native permettra de mettre en évidence d'éventuelles relations entre les anomalies moléculaires de l'EDA et la sévérité du phénotype dentaire [Zhang et coll., 2004]. La position des résidus mutés au niveau de la structure tridimensionnelle de l'EDA-A1 et de son site de liaison au récepteur EDAR pourra être étudiée par cette approche de modélisation moléculaire [Li et coll., 2008]. Ainsi, il devrait être possible de mieux comprendre d'éventuels effets phénotypiques différentiels des modifications structurales du site d'homologie TNF et du site furine.

L'analyse approfondie de la nature des modifications structurales osseuses observées dans la DEX nécessitera, chez l'homme, des approches permettant l'étude de la densité osseuse. Des techniques d'absorptiométrie duale aux RX (DEXA) pourront être utilisées pour rechercher d'éventuelles modifications *in vivo* de la densité minérale osseuse et l'existence de zones d'hyperminéralisation [Giampetro et coll., 2007 ; Schwaederer et coll., 2008 ; Mann

et coll., 2008 ; Sahakitrungruang et coll., 2008]. Une analyse par microspectroscopie infrarouge ou diffraction aux RX des prélèvements osseux provenant de patients DEX et de souris Tabby permettrait d'objectiver, *in vitro*, les modifications de densité minérale osseuse liées à la mutation *EDA* [Boskey et coll., 2003 ; Said et coll., 2008 ; Verdelis et coll., 2008]. Il devrait être possible de détecter des variations topographiques de la structure osseuses chez des patients DEX et chez la souris Tabby soit par microtomographie ( $\mu$ -CT), soit par microscopie électronique à balayage [Rühli et coll., 2007 ; Lan et coll., 2007].

Nos observations phénotypiques nécessitent une meilleure connaissance du fonctionnement des ostéoblastes ou des ostéoclastes, ainsi que des mécanismes moléculaires mis en jeu. A l'échelle cellulaire, les anomalies des fonctions ostéoblastiques seront abordées par immunohistochimie, sur des prélèvements osseux de souris Tabby. Les marqueurs moléculaires ostéoblastiques comme la BSP, l'ostéocalcine, Runx2, la sclérostine ou la Phosphatase Alcaline seront immunolocalisés au niveau de mandibules de souris Tabby à différents stades de développement et sur des prélèvements osseux de patients DEX, réalisés durant la phase chirurgicale implantaire [Bianco et coll., 1991; Ziolkowska et coll., 2006; Coussens et coll., 2008]. Des cultures cellulaires à partir de prélèvements réalisées chez des embryons de souris Tabby devraient permettre d'étudier le phénotype ostéoblastique. Le phénotype osseux sera étudié par des dosages par RT-PCR et Western-blot, à partir du surnageant de culture cellulaire de marqueurs ostéoblastiques précoces (Activité enzymatique Phosphatase Alcaline) et tardifs (ostéonectine, ostéocalcine) [Hoshi et coll., 1997 ; Hessle et coll., 2002 ; Coussens et coll., 2008]. Les éventuelles altérations des fonctions ostéoclastiques pourront être testées sur des prélèvements osseux murins et humains par un marquage histochimique de la Phosphatase alcaline Tartrate-Résistante [Ogino et coll., 2008]. La compréhension des mécanismes moléculaires impliqués dans le phénotype osseux de la DEX fera appel à l'analyse, sur un modèle de culture cellulaire, de l'expression de facteurs transcriptionnels ostéogéniques comme *Runx2* [Charoenphandhu et coll., 2008]. L'étude de l'expression des molécules de la voie de signalisation de RANKL et de son inhibiteur endogène l'ostéoprotégérine permettront d'appréhender les mécanismes de différenciation ostéoclastiques [Schubert et coll., 2008].

Les altérations métaboliques et structurales osseuses qui seront identifiées dans la DEX devraient permettre une amélioration de la démarche diagnostique en phase pré-implantaire, ainsi qu'une adaptation des techniques chirurgicales.

## **BIBLIOGRAPHIE**



- ACIKGOZ A, KADEMOGLU O, ELEKDAG-TÜRK S, KARAGOZ F. Hypohidrotic ectodermal dysplasia with true anodontia of the primary dentition. *Quintessence Int* 2007; 38 : 853-8.
- ALCAN T, BASA S, KARGUL B. Growth analysis of a patient with ectodermal dysplasia treated with endosseous implants : 6-year follow-up. *J Oral Rehabil* 2006; 33 : 175-82.
- ALKALAY I, YARON A, HATZUBAI A, ORIAN A, CIECHANOVER A, BEN-NERIAH Y. Stimulation-dependent I kappa B alpha phosphorylation marks the NF-kappa B inhibitor for degradation via the ubiquitin-proteasome pathway. *Proc Natl Acad Sci* 1995; 92 : 10599-603.
- ARADHYA S, NELSON D. NF-kappaB signaling and human disease. *Curr Opin Genet Dev* 2001; 11 : 300-6.
- ARANYARACHKUL P, CARUSO J, GANTES B, SCHULZ E, RIGGS M, DUS I ET COLL. Bone density assessments of dental implant sites : 2. Quantitative cone-beam computerized tomography. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2005; 20 : 416-24
- ARMSTRONG AP, TOMETSKO ME, GLACCUM M, SUTHERLAND CL, COSMAN D, DOUGALL WCJ. A RANK/TRAF6-dependent signal transduction pathway is essential for osteoclast cytoskeletal organization and resorptive function. *Biol Chem*. 2002; 277 : 44347-56.
- ARSLAN S, KAMA J, OZER T, YAVUZ I. Craniofacial and upper airway cephalometric in Hypohidrotic Ectodermal Dysplasia. *Dentomaxillofac Radiol* 2007; 36 : 478-83.
- ARTE S, NIEMINEN P, APAJALAHTI S, HAAVIKKO K, THESLEFF I, PIRINEN S. Characteristics of incisor-premolar hypodontia in families. *J Dent Res* 2001; 80 : 1445-50.
- ASAGIRI M, TAKAYANAGI H. The molecular understanding of osteoclast differentiation. *Bone* 2007; 40 : 251-64.
- ASHIQUE AM, FU K, RICHMAN J. Signalling via type IA and type IB bone morphogenetic protein receptors (BMPR) regulates intramembranous bone formation, chondrogenesis and feather formation in the chicken embryo. *Int J Dev Biol* 2002; 46 : 243-53.
- ASWEGAN AL, JOSEPHSON KD, MOWBRAY R, PAULI RM, SPRITZ RA, WILLIAMS MS. Autosomal dominant hypohidrotic ectodermal dysplasia in a large family. *Am J Med Genet* 1997; 72 : 462-7.
- AYBAR MJ, MAYOR R. Early induction of neural crest cells : lessons learned from frog, fish and chick. *Curr Opin Genet Dev* 2002;12 : 452-8.
- BAL E, BAALA L, CLUZEAU C, EL KERCH F, OULDIM K, HADJ-RABIA S ET COLL. Autosomal dominant anhidrotic ectodermal dysplasias at the EDARADD locus. *Hum Mutat* 2007; 28 : 703-709.
- BALDWIN AS Jr. The NF-kappa B and I kappa B proteins : new discoveries and insights. *Annu Rev Immunol* 1996;14 : 649-83.
- BARBERIA E, SAAVEDRA D, ARENAS M, MAROTO M. Multiple agenesis and anhidrotic ectodermal dysplasia : a comparative longitudinal study of dental similarities and genetic differences in two groups of children. *Eur J Paediatr Dent* 2006; 7 : 113-21.
- BARLOW AJ, BOGARDI JP, LADHER R, FRANCIS-WEST PH. Expression of chick Barx-1 and its differential regulation by FGF-8 and BMP signaling in the maxillary primordia. *Dev Dyn* 1999; 214 : 291-302.
- BASCH ML, BRONNER-FRASER M. Neural crest inducing signals. *Adv Exp Med Biol* 2006; 589 : 24-31.
- BAYÉS M, HARTUNG AJ, EZER S, PISPA J, THESLEFF I, SRIVASTAVA AK, ET COLL. The anhidrotic ectodermal dysplasia gene (EDA) undergoes alternative splicing and encodes ectodysplasin-A with deletion mutations in collagenous repeats. *Hum Mol Genet*. 1998; 7 : 1661-9.
- BECKTOR KB, BECKTOR JP, KELLER EE. Growth analysis of a patient with ectodermal dysplasia treated with endosseous implants : a case report. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2001; 16 : 864-74.

- BEG AA, BALDWIN AS JR. The I kappa B proteins : multifunctional regulators of Rel/NF-kappa B transcription factors. *Genes Dev* 1993; 7 : 2064-70.
- BEI M, KRATOCHWIL K, MAAS RL. BMP4 rescues a non-cell-autonomous function of Msx1 in tooth development. *Development* 2000; 127 : 4711-8.
- BEI M, MAAS R. FGFs and BMP4 induce both Msx-1-independent and Msx-1-dependant signalling pathways in early tooth development. *Development* 1998; 125 : 4325-33.
- BELIAKOV A, ELIZAROVA VM, SMIRNOVA TA, KROTOV V. Primary anodontia in X-linked hypohidrotic ectodermal dysplasia. *Stomatologija* 1998; 77 : 29-31.
- BENNETT CN, LONGO KA, WRIGHT WS, SUVA LJ, LANE TF, HANKENSON KD, ET COLL. Regulation of osteoblastogenesis and bone mass by Wnt10b. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005; 102 : 3324-9.
- BERDAL A, LEZOT F, PIBOUIN L, HOTTON D, GHOUL-MAZGAR S, TEILLAUD C ET COLL. Msx1 homeogene antisense mRNA in mouse dental and bone cells. *Connect Tissue Res* 2002; 43:148-52
- BERGENDAL B, EKMAN A, NILSSON P. Implant failure in young children with ectodermal dysplasia : a retrospective evaluation of use and outcome of dental implant treatment in children in Sweden. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2008; 23 : 520-4.
- BERGENDAL T, ECKERDAL O, HALLONSTEN AL, KOCH G, KUROL J, KVINT S. Osteointegrated implants in the oral habilitation of a boy with ectodermal dysplasia: a case report. *Int Dent J* 1991; 41 : 149-56
- BEZERRA MC, CARVALHO JF, PROKOPOWITSCH AS, PEREIRA RM. RANK, RANKL and osteoprotegerin in arthritic bone loss. *Braz J Med Biol Res* 2005; 38: 161-70.
- BIANCO P, FISHER LW, YOUNG MF, TERMINE JD, ROBEY PG. Expression of bone sialoprotein (BSP) in developing human tissues. *Cacif Tissue Int* 1991; 49: 421-6
- BLECHER SR, KAPALANGA J, LALONDE D. Induction of sweat glands by epidermal growth factor in murine X-linked anhidrotic ectodermal dysplasia. *Nature* 1990; 7: 542-4.
- BLIN-WAKKACH C, WAKKACH A, SEXTON PM, ROCHET N, CARLE GF. Hematological defects in the oc/oc mouse, a model of infantile malignant osteopetrosis. *Leukemia* 2004; 18: 1505-11.
- BOJ JR, DURAN J, CORTADA M, JIMENEZ A, GOLOBART J. Cephalometric changes in a patient with ectodermal dysplasia after placement of dentures. *J Clin Pediatr Dent* 1993; 17: 217-20.
- BONDARETS N, JONES RM, McDONALD F. Analysis of facial growth in subjects with syndromic ectodermal dysplasia : a longitudinal analysis. *Orthod Craniofac Res* 2002; 5: 71-84.
- BORAN T, LESOT H, PETERKA M, PETERKOVA R. Increased apoptosis during morphogenesis of the lower cheek teeth in tabby/EDA mice. *J Dent Res* 2005; 84 : 228-33.
- BOSKEY AL, MOORE DJ, AMLING M, CANALIS E, DELANY AM. Infrared analysis of the mineral and matrix in bones of osteonectin-null mice and their wildtype controls. *J Bone Miner Res* 2003; 18, 1005-11
- BRONCKERS AL, SASAGURI K, ENGELSE MA. Transcription and immunolocalization of Runx2/Cbfa1/Pebp2alphaA in developing rodent and human craniofacial tissues: further evidence suggesting osteoclasts phagocytose osteocytes. *Microsc Res Tech* 2003; 61: 540-8.
- BUSHDID PB, CHEN CL, BRANTLEY DM, YULL F, RAGHOW R, KERR LD, ET COLL. NF-kappaB mediates FGF signal regulation of msx-1 expression. *Dev Biol* 2001; 237 : 107-15.
- CAMBIAGHI S, RESTANO L, PAAKKONEN K, CAPUTO R, KERE J. Clinical findings in mosaic carriers of hypohidrotic ectodermal dysplasia. *Arch Dermatol* 2000; 136 : 217-24.
- CARROL ED, GENNERY AR, FLOOD TJ, SPICKETT GP, ABINUN M. Anhidrotic ectodermal dysplasia and immunodeficiency : the role of NEMO. *Arch Dis Child* 2003; 88 : 340-1.



- CASAL ML, LEWIS JR, MAULDIN EA, TARDIVEL A, INGOLD K, FAVRE M ET COLL. Significant correction of disease after postnatal administration of recombinant ectodysplasin A in a canine X-linked ectodermal dysplasia. *Am J Hum Genetic* 2007; 81: 1050-6.
- CASAL ML, MAULDIN EA, RYAN S, SCHEIDT JL, KENNEDY J, MOORE PF, ET COLL. Frequent respiratory infections in the canine model of X-linked ectodermal dysplasia are not caused by an immune deficiency. *Vet Immunol Immunopathol* 2005; 107: 95-104.
- CASAL ML, SCHEIDT JL, RHODES JL, HENTORN PS, WERNER P. Mutation identification in a canine model of X-linked ectodermal dysplasia. *Mamm Genome* 2005; 16 : 524-31.
- CASCALLANA JL, BRAVO A, DONET E, LEIS H, LARA MF, PARAMIO JM ET COLL. Ectoderm-targeted overexpression of the glucocorticoid receptor induces hypohidrotic ectodermal dysplasia. *Endocrinology* 2005; 146 : 2629-38.
- CHAI Y, MAXSON RE JR. Recent advances in craniofacial morphogenesis. *Dev Dyn* 2006; 235 : 2353-75.
- CHAISSON ML, BRANSTETTER DG, DERRY JM, ARMSTRONG AP, TOMETSKO ME, TAKEDA K ET COLL. Osteoclast differentiation is impaired in the absence of inhibitor of kappa B kinase alpha. *J Biol Chem* 2004; 279 : 54841-48.
- CHAO SC, CHUNG CH, YANG CC, YANG MH, LEE JY. Mutation analysis of X-linked hypohidrotic ectodermal dysplasia in a Taiwanese family. *J Formos Med Assoc* 2003; 102 : 412-7.
- CHAROENPHANDHU N, TEERAPORNPUKAKIT J, METHAWASIN M, WONGDEE K, THONGCHOTE K, ET COLL. Prolactin decreases expression of Runx2, osteoprotegerin, and RANKL in primary osteoblasts derived from tibiae of adult female rats. *Can J Physiol Pharmacol* 2008; 86:240-8
- CHASSAING N, BOURTHOMIEU S, COSSEE M, CALVAS P, VINCENT MC. Mutations in EDAR account for one-quarter of non-ED1-related hypohidrotic ectodermal dysplasia. *Hum Mutat* 2006; 27 : 255-9.
- CHEN Y, BAL BS, GORSKI JP. CALCIUM AND COLLAGEN BINDING PROPERTIES OF OSTEOPOINTIN, BONE SIALOPROTEIN, AND BONE ACIDIC GLYCOPROTEIN-75 FROM BONE. *J BIOL CHEM* 1992; 267 : 24871-8.
- CHIODINI I, SCILLATANI A. Role of cortisol hypersecretion in the pathogenesis of osteoporosis. *Recenti Prog Med* 2008; 99:309-13
- CHIU HC, CHEN CH, HO ML, LIU HW, WU SF, CHANG JK. Longitudinal changes in bone mineral density of healthy elderly men in Southern Taiwan. *J Formos Med Assoc* 2008; 107 : 653-8.
- CIVITELLI R, MCALISTER WH, TEITELBAUM SL, WHYTE MP. Central osteosclerosis with ectodermal dysplasia : clinical, laboratory, radiologic, and histopathologic characterization with review of the literature. *J Bone Miner Res* 1989; 4 : 863-75.
- CLAUSS F. Les dysplasies ectodermiques : présentation du syndrome, des prises en charge thérapeutiques et des orientations de recherche. *Le Chirurgien Dentiste de France* 2005 ; 25-29.
- COBOURNE MT, SHARPE PT. Tooth and jaw : molecular mechanisms of patterning in the first branchial arch. *Arch Oral Biol* 2003; 48 : 1-14.
- COIN R, LESOT H, VONESCH JL, HAIKEL Y, RUCH JV. 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* 1999; 43 : 261-7.
- COURTNEY JM, BLACKBURN J, SHARPE PT. The Ectodysplasin and NFkappaB signalling pathways in odontogenesis. *Arch Oral Biol* 2005; 50 : 159-63.
- COURTOIS G, SMAHI A, ISRAEL A. NEMO/IKK gamma linking NF-kappa B to human disease. *Trends Mol Med* 2001; 7 : 427-30.

- COUSSENS AK, HUGHES IP, MORRIS CP, PWELL BC, ANDERSON PJ. In vitro differentiation of human calvarial suture derived cells with and without dexamethasone does not induce in vivo-like expression. *J Cell Physiol* 2008 (in press).
- CRAWFORD PJ, ALDRED MJ, CLARKE A. Clinical and radiographic dental findings in X linked hypohidrotic ectodermal dysplasia. *J Med Genet* 1991; 28 : 181-5.
- CRUMP JG, MAVES L, LAWSON ND, WEINSTEIN BM, KIMMEL CB. An essential role for Fgf in endodermal pouch formation influences later craniofacial skeletal patterning. *Development* 2004; 131 : 5703-16.
- CUI CY, DURMOWICZ M, TANAKA TS, HARTUNG AJ, TEZUKA T, HASHIMOTO K ET COLL. EDA targets revealed by skin gene expression profiles of wild-type, Tabby and Tabby EDA-A1 transgenic mice. *Hum Mol Genet* 2002; 11 : 1763-73.
- DAROSZEWSKA A, RALSTON SH. Genetics of Paget's disease of bone. *Clin Sci* 2005; 109 : 257-63.
- DEGUCHI T, NASU M, MURAKAMI K, YABUUCHI T, KAMIOKA H, TAKANO-YAMAMOTO T. Quantitative evaluation of cortical bone thickness with computed tomographic scanning for orthodontic implants. *Am J orthod Dentofacial Orthop* 2006; 129:7-12
- DEGUCHI T, YOSHIHARA A, HANADA N, MIYAZAKI H. Relationship between mandibular inferior cortex and general bone metabolism in older adults. *Osteoporos Int* 2008; 19:935-40
- DE OLIVEIRA RC, LELES CR, NORMANHA LM, LINDH C, RIBEIRO-ROTTA RF. Assessments of trabecular bone density at implant sites on CT images. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2008; 105 : 231-8.
- DELLAVIA C, CATTI F, SFORZA C, GRANDI G, FERRARIO VF. Non-invasive longitudinal assessment of facial growth in children and adolescents with hypohidrotic ectodermal dysplasia. *Eur J Oral Sci* 2008; 116 : 305-11.
- DELLAVIA C, SFORZA C, MALERBA A, STROHMENGER L, FERRARIO VF. Palatal size and shape in 6-year old affected by hypohidrotic ectodermal dysplasia. *Angle Orthod* 2006; 76 : 978-83.
- DÖFFINGER R, SMAHI A, BESSIA C, GEISSMANN F, FEINBERG J, DURANDY A. ET COLL. X-linked anhidrotic ectodermal dysplasia with immunodeficiency is caused by impaired NF-kappaB signaling. *Nat Genet* 2001; 27 : 277-85.
- DOUGALL WC, CHAISSON M. The RANK/RANKL/OPG triad in cancer-induced bone diseases. *Cancer Metastasis Rev* 2006; 25 : 541-9.
- DUMIĆ M, CVITANOVIC M, ILLE J, POTOCKI K. Syndrome of short stature, mental deficiency, microcephaly, ectodermal dysplasia, and multiple skeletal anomalies. *Am J Med Genet* 2000; 93 : 47-51.
- DUPUIS-GIROD S, CORRADINI N, HADJ-RABIA S, FOURNET JC, FAIVRE L, LE DEIST F ET COLL. Osteopetrosis, lymphedema, anhidrotic ectodermal dysplasia, and immune-deficiency in a boy and incontinentia pigmenti in his mother. *Pediatrics* 2002; 109 : 97-103.
- EASTELL R, HANNON RA. Biomarkers of bone health and osteoporosis risk. *Proc Nutr Soc* 2008; 67 : 157-62
- ELOMAA O, PULKKINEN K, HANNELIUS U, MIKKOLA M, SAARIALHO-KERE U, KERE J. ECTODYSPLASIN IS RELEASED BY PROTEOLYTIC SHEDDING AND BINDS TO THE EDAR PROTEIN. *HUM MOL GENET* 2001; 10 : 953-62.
- EZER S, BAYÉS M, ELOMAA O, SCHLESSINGER D, KERE J. Ectodysplasin is a collagenous trimeric type II membrane protein with a tumor necrosis factor-like domain and co-localizes with cytoskeletal structures at lateral and apical surfaces of cells. *Hum Mol Genet* 1999; 8 : 2079-86.
- FALCONER D.S. A totally sex-linked gene in the house mouse. *Nature* 1952; 169 : 664-5.
- FARACH-CARSON MC, WRIGHT GC, BUTLER WT. Improved binding of acidic bone matrix proteins to cationized filters during solid phase assays. *Bone Miner* 1992; 16:1-9

- FERGUSON BM, BROCKDORFF N, FORMSTONE E, NGYUEN T, KRONMILLER JE, ZONANA J. Cloning of Tabby, the murine homolog of the human EDA gene : evidence for a membrane-associated protein with a short collagenous domain. *Hum Mol Genet* 1997; 6 : 1589-94.
- FERGUSON BM, THOMAS NS, MUNOZ F, MORGAN D, CLARKE A, ZONANA J. Scarcity of mutations detected in families with X linked hypohidrotic ectodermal dysplasia : diagnostic implications. *J Med Genet* 1998; 35 : 112-5.
- FERRARIO V, DELLAVIA C, SERRAO G, SFORZA C. Soft-tissue facial areas and volumes in individuals with ectodermal dysplasia. *Am J Med Genet* 2004; 126 : 253-60.
- FLEISCHMANNOVA J, MATALOVA E, TUCKER AS, SHARPE PT. Mouse models of tooth abnormalities. *Eur J Oral Sci* 2008; 116:1-10
- FRANCHI L, BRANCHI R, TOLLARO I. Craniofacial changes following early prosthetic treatment in a case of hypohidrotic ectodermal dysplasia with complete anodontia. *ASDC J Dent Child* 1998; 65 : 116-21.
- FRANCIS-WEST P, LADHER R, BARLOW A, GRAVESON A. Signalling interactions during facial development. *Mech Dev* 1998; 75 : 3-28.
- FRANZÉN A, HULTENBY K, REINHOLT FP, ONNERFJORD P, HEINEGÅRD D. Altered osteoclast development and function in osteopontin deficient mice. *J Orthop Res* 2008; 26 : 721-8.
- FRANZOSO G, CARLSON L, XING L, POLJAC L, SHORES E, BROWN K ET COLL. Requirement for NF- $\kappa$ B in osteoclast and B-cell development. *Genes development* 1997; 11 : 3482-96.
- FREIRE-MAIA N, PINHEIRO M. Precocious mortality in Christ-Siemens-Touraine syndrome. *Am J Med Genet* 1990; 37 : 299.
- FROMMER J, MARGOLIES MR. Contribution of Meckel's cartilage to ossification of the mandible in mice. *J. Dent Res* 1971 ; 50 :1260-7
- FU Q, JILKA RL, MANOLAGAS SC, O'BRIEN CA. Parathyroid hormone stimulates receptor activator of NF $\kappa$ B ligand and inhibits osteoprotegerin expression via protein kinase A activation of cAMP-response element-binding protein. *J Biol Chem* 2002; 277 : 48868-75.
- FUJITA T, NOLAN GP, GHOSH S, BALTIMORE D. Independent modes of transcriptional activation by the p50 and p65 subunits of NF- $\kappa$ B. *Genes Dev* 1992; 6 : 775-87
- GAIDE O, SCHNEIDER P. Permanent correction of an inherited ectodermal dysplasia with recombinant EDA. *Nat Med* 2003; 9 : 614-8.
- GAJEWSKA J, AMBROSZKIEWICZ J, RADOMYSKA B, CHELCHOWSKA M, OLTARZEWSKI M, LASKOWSKA-KLITA T. Serum markers of bone turnover in children and adolescents with classic galactosemia. *Adv med Sci* 2008 (in press)
- GALIBERT L, TOMETSKO M, ANDERSON D, CASMAN D, DOUGLAS W. The involvement of multiple Tumor Necrosis Factor (TNFR)-associated factors in the signaling mechanisms of Receptor Activator of NF- $\kappa$ B, a member of TNFR superfamily. *J Biol Chem* 1998; 273 : 34120-7.
- GAUR U, AGGARWAL BB. Regulation of proliferation, survival and apoptosis by members of the TNF superfamily. *Biochem Pharmacol* 2003; 66:1403-8
- GIAMPIETRO PF, PETERSON MG, SCHNEIDER R, DAVIS JG, BURKE SW, BOACHIE-ADJEI O ET COLL. Bone mineral density determinations by dual-energy x-ray absorptionmetry in the management of patients with Marfan syndrome-some factors which affect the measurement. *HSS J* 2007; 3 : 89-92
- GLAVINA D, MAJSTOROVIC M, LULIC-DUKIC O, JURIC H. Hypohidrotic ectodermal dysplasia : dental features and carriers detection. *Coll Antropol* 2001; 25 : 303-310.
- GOHDA J, AKIYAMA T, KOGA T, TAKAYANAGI H, TANAKA S, INOUE J. RANK-mediated amplification of TRAF6 signaling leads to NFATc1 induction during osteoclastogenesis. *Embo J* 2005; 24 : 790-9.

- GRAVALLESE EM, GALSON DL, GOLDRING SR, AURON PE. The role of TNF-receptor family members and other TRAF-dependent receptors in bone resorption. *Arthritis Res* 2001; 3:9-12
- GRIMSTON SK, SCREEN J, HASKELL JH, CHUNG DJ, BRODT MD, SILVA MJ, CIVITELLI R. Role of connexin43 osteoblast response to physical load. *Ann N Y Acad Sci* 2006; 1068:214-24
- GRÜNEBERG H. More about the tabby mouse and about the Lyon hypothesis. *J Embryol Exp Morphol.* 1966; 16 : 569-90.
- GRÜNEBERG H. The tabby syndrome in the mouse. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 1971; 179 : 139-56.
- GUCKES A, ROBERTS M, MC CARTHY G. Pattern of permanent teeth present in individual with ectodermal dysplasia and severe hypodontia suggests treatment with dental implants. *Pediatr Dent* 1998; 20 : 278-80.
- GUCKES A, SCURRIA M, KING T, MC CARTHY G, BRAHIM J. Prospective clinical trial of dental implants in persons with ectodermal dysplasia. *J Prosth Dent* 2002; 88 : 21-5.
- GUINTO JB, RITSON GP, TAYLOR JP, FORMAN MS. Valosin-containing protein and the pathogenesis of frontotemporal dementia associated with inclusion body myopathy. *Acta Neuropathol* 2007; 114 : 55-61.
- HAN J, ITO Y, YEO JY, SUCOV HM, MAAS R, CHAI Y. Cranial neural crest-derived mesenchymal proliferation is regulated by Msx-1 mediated p19 (INK4d) expression during odontogenesis. *Dev Biol* 2003; 261 : 183-96.
- HARRIS SE, GLUHAK-HEINRICH J, HARRIS MA, YANG W, BONEWALD LF, RIHA D ET COLL. DMP1 and MEPE expression are elevated in osteocytes after mechanical loading in vivo : theoretical role in controlling mineral quality in the perilacunar matrix. *J Musculoskelet Neuronal Interact* 2007; 7:313-5
- HASHIGUCHI T, YOTSUMOTO S, KANZAKI T. Mutations in the ED1 gene in Japanese families with X-linked hypohidrotic ectodermal dysplasia. *Exp Dermatol* 2003; 12 : 518-522.
- HAWORTH KE, HEALY C, MORGAN P, SHARPE PT. Regionalisation of early head ectoderm is regulated by endoderm and prepatterns the orofacial epithelium. *Development* 2004; 131 : 4797-806.
- HAYMAN AR, JONES SJ, BOYDE A, FOSTER D, COLLEDGE WH, CARLTON MB, ET COLL. Mice lacking tartrate-resistant acid phosphatase (Acp 5) have disrupted endochondral ossification and mild osteopetrosis. *Development* 1996; 122 : 3151-62.
- HEADON DJ, EMMAL SA, FERGUSON BM, TUCKER AS, JUSTICE MJ, SHARPE PT, ET COLL. Gene defect in ectodermal dysplasia implicates a death domain adapter in development. *Nature* 2001; 414 : 913-6.
- HELMS JA, CORDERO D, TAPADIA MD. New insights into craniofacial morphogenesis. *Development* 2005; 132 : 851-61.
- HESSLE L, JOHNSON KA, ANDERSON HC, NARISAWA S, SALI A, GODING JW, ET COLL. Tissue-nonspecific alkaline phosphatase and plasma cell membrane glycoprotein-1 are central antagonistic regulators of bone mineralization. *Proc Natl Acad Sci* 2002; 99 : 9445-9.
- HIKITA A, YANA I, WAKEYAMA H, NAKAMURA M, KADONO Y, OSHIMA Y, ET COLL. Negative regulation of osteoclastogenesis by ectodomain shedding of receptor activator of NF-kappaB ligand. *Biol Chem* 2006; 281 : 36846-55.
- HILL NL, LAIB A, DUNCAN MK. Mutation of the ectodysplasin-A gene results in bone defects in mice. *J Comp Pathol* 2002; 126 : 220-5.
- HIZLI S, OZDEMIR S, BAKKALOGLU A. Anhidrotic ectodermal dysplasia (Christ-Siemens-Touraine syndrome) presenting as a fever of unknown origin. *Int J Dermatol* 1998; 37 : 132-4.
- HODGKINSON CA, MOORE KJ, NAKAYAMA A, STEINGRIMSSON E, COPELAND NG, JENKINS NA, ET COLL. Mutations at the mouse microphthalmia locus are associated with defects in a gene encoding a novel basic-helix-loop-helix-zipper protein. *Cell* 1993; 74 : 395-404

- HORTON MA, NESBIT MA, HELFRICH MH. Interaction of osteopontin with osteoclast integrins. *Ann N Y Acad Sci* 1995; 760 : 190-200.
- HOSHI K, AMIZUKA N, ODA K, IKEHARA Y, OZAWA H. Immunolocalization of tissue non-specific alkaline phosphatase in mice. *Histochem Cell Biol* 1997; 107 : 183-91.
- HUANG C, YAN A, KE T, WANG H, WANG X, SHEN J ET COLL. A novel de-novo frame-shift mutation of the EDA gene in a chinese Han family with hypohidrotic ectodermal dysplasia. *J Hum Genet* 2006; 51 : 1133-7.
- HUGHES AE, RALSTON SH, MARKEN J, BELL C, MACPHERSON H, WALLACE RG, VAN HUL W, ET COLL. Mutations in TNFRSF11A, affecting the signal peptide of RANK, cause familial expansile osteolysis. *Nat Genet* 2000; 24 : 45-8.
- HUI W, CAWSTON TE, RICHARDS CD, ROWAN AD. A model of inflammatory arthritis highlights a role for oncostatin M in pro-inflammatory cytokine-induced bone destruction via RANK/RANKL. *Arthritis Res Ther* 2005; 7 : 57-64.
- IHARA H, DENHARDT DT, FURUYA K, YAMASHITA T, MUGURUMA Y, TSUJI K, ET COLL. Parathyroid hormone-induced bone resorption does not occur in the absence of osteopontin. *J Biol Chem* 2001; 276 : 13065-71.
- IOTSOVA V, CAAMAÑO J, LOY J, YANG Y, LEWIN A, BRAVO R. Osteopetrosis in mice lacking NF-kappaB1 and NF-kappaB2. *Nat Med* 1997; 3 : 1285-9.
- ISGAARD J, NILSSON A, LINDAHL A, ISAKSSON OG. Effects of GH and IGF-1 on longitudinal bone growth in rats. *Am J physiol endocrinol metab* 1986; 250 : 367-72.
- ISHIMURA A, MAEDA R, TAKEDA M, KIKKAWA M, DAAR I, MAENO M. Involvement of BMP-4/Msx-1 and FGF pathways in neural induction in the xenopus embryo. *Dev Growth Differ* 2000; 42 : 307-16.
- ITIN PH, FISTAROL SK. Ectodermal dysplasias. *Am J Med Genet* 2004; 15 : 45-51.
- JAMES CT, OHAZAMA A, TUCKER AS, SHARPE PT. Tooth development is independent of a Hox patterning programme. *Dev Dyn* 2002; 225 : 332-5.
- JERNVALL J, KETTUNEN P, KARAVANOVA I, MARTIN LB, THESLEFF I. 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* 1994; 38 : 463-9.
- JIN Q, CIRELLI JA, PARK CH, SUGAI JV, TABA M JR, KOSTENIUK PJ, ET AL. RANKL inhibition through osteoprotegerin blocks bone loss in experimental periodontitis. *J Periodontol* 2007; 78 : 1300-8.
- JOHNSON EL, ROBERTS MW, GUCKES AD, BAILEY LJ, PHILLIPS CL, WRIGHT JT. Analysis of craniofacial development in children with hypohidrotic ectodermal dysplasia. *Am J Med Genet* 2002; 112 : 327-34.
- JORGENSON RJ. The conditions manifesting taurodontism. *Am J Med Genet* 1982; 11 : 435-2.
- JOWETT AK, VAINIO S, FERGUSON MW, SHARPE PT, THESLEFF I. Epithelial-mesenchymal interactions are required for msx 1 and msx 2 gene expression in the developing murine molar tooth. *Development* 1993; 117 : 461-70.
- KANZLER B, FOREMAN R, LABOSKY P, MALLO M. BMP signaling is essential for development of skeletogenic and neurogenic cranial neural crest. *Development* 2000; 127 : 1096-104.
- KARTSOGIANNIS V, ZHOU H, HORWOOD NJ, THOMAS RJ, HARDS DK, QUINN JM, ET COLL. Localization of RANKL (receptor activator of NF kappa B ligand) mRNA and protein in skeletal and extraskeletal tissues. *Bone* 1999; 25 : 525-34.
- KEARNS G, SHARMA A, PERROT D, SCHMIDT B, KABAN L, VARGERVIK K. Placement of endosseous implants in children and adolescents with hereditary ectodermal dysplasia. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 1999; 88 : 5-10.

- KENWRICK S. Incontinentia pigmenti : the first single gene disorder due to disrupted NF-kappa B function. Ernst Schering Res Found Workshop 2002; 36 : 95-107.
- KERE J, SRIVASTAVA AK, MONTONEN O, ZONANA J, THOMAS N, FERGUSON B ET COLL. X-linked anhidrotic (hypohidrotic) ectodermal dysplasia is caused by mutation in a novel transmembrane protein. Nat Genet 1996; 13 : 409-16.
- KETTUNEN P, THESLEFF I. Expression and function of FGFs-4, -8, and -9 suggest functional redundancy and repetitive use as epithelial signals during tooth morphogenesis. Dev Dyn 1998; 211 : 256-68.
- KHOSLA S. Minireview : the OPG/RANKL/RANK system. Endocrinology. 2001; 142 : 5050-5.
- KIRSCH T, KIM HJ, WINKLES JA. Progressive ankylosis gene (ank). Regulates osteoblast differentiation. Cells Tissues Organs 2008 (in press)
- KNIGHT RD, SCHILLING TF. Cranial neural crest and development of the head skeleton. Adv Exp Med Biol 2006; 589 : 120-33.
- KOBIELAK A, KOBIELAK K, WISNIEWSKI SA, MIDRO AT, TRZECIAK WH. Sequence polymorphisms of the EDA and the DL genes in the patients with an X-linked and an autosomal forms of anhidrotic ectodermal dysplasia. Folia Histochem Cytobiol 2001; 39 : 113-4.
- KOBIELAK K, KOBIELAK A, ROSZKIEWICZ J, WIERZBA J, LIMON J, TRZECIAK WH. Mutations in the EDA gene in three unrelated families reveal no apparent correlation between phenotype and genotype in the patients with an X-linked anhidrotic ectodermal dysplasia. Am J Med Genet 2001; 100 : 191-7.
- KOMAROV AP, ROKHLIN OW, YU CA, GUDKOV AV. Functional genetic screening reveals the role of mitochondrial cytochrome b as a mediator of FAS-induced apoptosis. Proc Natl Acad Sci 2008; Sep 16.
- KRAMER F, BAETHGE C, TSCHERNITSCHKEK H. Implants in children with ectodermal dysplasia : a case report and literature review. Clin Oral Impl Res 2007; 18 : 140-6.
- KRISTENOVÁ P, PETERKA M, LISI S, GENDRAULT JL, LESOT H, PETERKOVÁ R. Different morphotypes of functional dentition in the lower molar region of tabby (EDA) mice. Orthod Craniofac Res. 2002; 5 : 205-14.
- KURIHARA N, HIRUMA Y, ZHOU H, SUBLER MA, DEMPSTER DW, SINGER FR ET COLL. Mutation of the sequestosome 1 (p62) gene increases osteoclastogenesis but does not induce Paget disease. J Clin Invest 2007; 117 : 133-42.
- LABONNE C, BRONNER-FRASER M.. Molecular mechanisms of neural crest formation. Annu Rev Cell Dev Biol 1999; 15 : 81-112.
- LABRUNE P. Challenges of genetic diseases. About a genetic disease : cystic fibrosis. Rev Prat 2002; 52:679-82
- LAI MC, KING NM, WONG HM. Dental development of Chinese children with cleft lip and palate. Cleft Palate Craniofac J 2008; 45:289-96
- LAN J, WANG ZF, SHI B, XIA HB, CHENG XR. The influence of recombinant human BMP-2 on bone-implant osseointegration : biomechanical testing and histomorphometric analysis. Int J Oral Maxillofac Surg 2007; 36:345-9
- LAMARTINE J. Towards a new classification of ectodermal dysplasias. Clin Exp Dermatol 2003; 28 : 351-5.
- LAMOTHE B, WEBSTER WK, GOPINATHAN A, BESSE A, CAMPOS AD, DARNAY BG. TRAF6 ubiquitin ligase is essential for RANKL signaling and osteoclast differentiation. Biochem Biophys Res Commun 2007; 359 : 1044-9.

- LAURIKKALA J, MIKKOLA M, MUSTONEN T, ABERG T, KOPPINEN P, PISPA J ET COLL. TNF signaling via the ligand-receptor pair ectodysplasin and edar controls the function of epithelial signaling centers and is regulated by Wnt and activin during tooth organogenesis. *Dev Biol* 2001; 229 : 443-55.
- LE DOUARIN NM, CREUZET S, COULY G, DUPIN E. Neural crest cell plasticity and its limits. *Development* 2004; 131 : 4637-50.
- LEE ZH, KIM HH. Signal transduction by receptor activator of nuclear factor kappa B in osteoclasts. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; 305 : 211-4.
- LEKHOLM U. Osseointegrated implants in clinical practice. *J Oral Implantol* 1986; 12 : 357-64.
- LEKHOLM U, ZARB GA. Patient selection and preparation. In : *Branemark, P.I Zarb, Albrektsson T; Editors. Tissue integrated prostheses : osseointegration in clinical dentistry*. Chicago ; Quintessence 1985; 199-209
- LESOT H, KRISTENA P, HAZE A, DEUTSCH D, PETERKA, PETERKOVA R. COST B23 initiatives. Lower incisor in the Tabby mutant mouse. *8<sup>th</sup> conference on the chemistry and biology of mineralized tissues*. 2004 : 196-9.
- LESOT H, PETERKOVÁ R, KRISTENOVÁ P, LISI S, PETERKA M. [Effect of the Tabby mutation on the dentition of mice] *Bull Group Int Rech Sci Stomatol Odontol* 2003; 45 : 1-11.
- LEVI G, MANTERO S, BARBIERI O, CANTATORE D, PALEARI L, BEVERDAM A ET COLL. Msx1 and Dlx5 act independently in development of craniofacial skeleton, but converge on the regulation of Bmp signaling in palate formation. *Mech Dev* 1986; 123 : 3-16.
- LEXNER M, BARDOW A, JUNCKER I, JENSEN L, ALMER L, KREIBORG S, HERTZ J. X-linked hypohidrotic ectodermal dysplasia. Genetic and dental findings in 67 Danish patients from 19 families. *Clin Genet* 2008 (in press).
- LEXNER MO, BARDOW A, BJORN-JOERGENSEN J, HERTZ JM, ALMER L, KREIBORG S. Anthropometric and cephalometric measurements in X-linked hypohidrotic ectodermal dysplasia. *Orthod Craniofac Res* 2007; 10 : 203-15.
- LEXNER MO, BARDOW A, HERTZ JM, NIELSEN LA, KREIBORG S. Anomalies of tooth formation in hypohidrotic ectodermal dysplasia. *Int J Paediatr Dent* 2007; 17 : 10-8.
- LIDRAL AC, REISING BC. The role of MSX1 in human tooth agenesis. *J Dent Res* 2008; 81 : 274-278.
- LIN TK, HUANG CY, LIN MH, CHAO SC. A novel 7-bp deletion mutation in a Taiwanese family with X-linked hypohidrotic ectodermal dysplasia. *Clin Exp Dermatol* 2004; 29 : 536-8.
- LIND LK, STECKSÉN-BLICKS C, LEJON K, SCHMITT-EGENOLF M. EDAR mutation in autosomal dominant hypohidrotic ectodermal dysplasia in two Swedish families. *BMC Med Genet* 2006; 7 : 80.
- LOMAGA MA, YEH WC, SAROSI I, DUNCAN GS, FURLONGER C, HO A ET COLL. TRAF6 deficiency results in osteopetrosis and defective interleukin-1, CD40, and LPS signaling. *Genes Dev* 1999; 13 : 1015-1022.
- LUBBERTS E. The role of IL-17 and family members in the pathogenesis of arthritis. *Curr Opin Investig Drugs* 2003; 4 : 572-7.
- LUCAS GJ, DAROSZEWSKA A, RALSTON SH. Contribution of genetic factors to the pathogenesis of Paget's disease of bone and related disorders. *J Bone Miner Res* 2006; Suppl 2 : 31-7
- LUMSDEN A, SPRAWSON N, GRAHAM A. Segmental origin and migration of neural crest cells in the hindbrain region of the chick embryo. *Development* 1991; 113 : 1281-91.
- MAKRIS C, ROBERTS JL, KARIN M. The carboxyl-terminal region of IkkappaB kinase gamma (IKKgamma) is required for full IKK activation. *Mol Cell Biol* 2002; 22 : 6573-81.

- MANCINI AJ, LAWLEY LP, UZEL G. X-linked ectodermal dysplasia with immunodeficiency caused by NEMO mutation : early recognition and diagnosis. *Arch Dermatol* 2008; 144 : 342-6.
- MANN ML, THORNLEY-BROWN D, CAMPBELL R, BELL E, BURROUGHS L, NUNNALLY N ET COLL. The effect of peritoneal dialysate on DXA bone densitometry results in patients with end-stage renal disease. *J Clin Densitom* 2008 (in press)
- MATALOVA E, FLEISCHMANNOVA J, SHARPE PT, TUCKER AS. Tooth agenesis : from molecular genetics to molecular dentistry. *J Dent Res* 2008; 87:617-23
- MATZUK MM, KUMAR TR, VASSALLI A, BICKENBACH JR, ROOP DR, JAENISCH R, ET COLL. Functional analysis of activins during mammalian development. *Nature* 1995; 374 : 354-6.
- MEYERS EN, LEWANDOSKI M, MARTIN GR. An Fgf8 mutant allelic series generated by Cre- and Flp- mediated recombination. *Nat Genet* 1998; 18 : 136-41.
- MIARD S, PETERKOVÁ R, VONESCH JL, PETERKA M, RUCH JV, LESOT H. Alterations in the incisor development in the Tabby mouse. *Int J Dev Biol* 1999; 43 : 517-29.
- MIKKOLA ML, PISPA J, PEKKANEN M, PAULIN L, NIEMINEN P, KERE J ET COLL. Ectodysplasin, a protein required for epithelial morphogenesis, is a novel TNF homologue and promotes cell-matrix adhesion. *Mech Dev* 1999; 88 : 133-46.
- MIKKOLA ML, THESLEFF I. Ectodysplasin signaling in development. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2003; 14 : 211-24.
- MILETICH I, SHARPE PT. Neural crest contribution to mammalian tooth formation. *Birth Defects Res C Embryo Today* 2004; 72 : 200-12.
- MILETICH I, SHARPE PT. Normal and abnormal dental development. *Hum Mol Genet* 2003; 12 : 69-73.
- MILLÁN JL, FISHMAN WH. Biology of human alkaline phosphatases with special reference to cancer. *Crit Rev Clin Lab Sci* 1995; 32 : 1-39.
- MIZUKAMI J, TAKAESU G, AKATSUKA H, SAKURAI H, NINOMIYA-TSUJI J, MATSUMOTO K, ET COLL. Receptor activator of NF-kappaB ligand (RANKL) activates TAK1 mitogen-activated protein kinase kinase through a signaling complex containing RANK, TAB2, and TRAF6. *Mol Cell Biol* 2002; 22 : 992-1000.
- MONREAL AW, FERGUSON BM, HEADON DJ, STREET SL, OVERBEEK PA, ZONANA J. Mutations in the human homologue of mouse dl cause autosomal recessive and dominant hypohidrotic ectodermal dysplasia. *J. Nat Genet* 1999; 22 : 366-9
- MONREAL AW, ZONANA J, FERGUSON B. Identification of a new splice form of the EDA1 gene permits detection of nearly all X-linked hypohidrotic ectodermal dysplasia mutations. *Am J Hum Genet* 1998; 63: 380-9.
- MONTONEN O, EZER S, SAARIALHO-KERE UK, HERVA R, KARJALAINEN-LINDSBERG ML, KAITILA I ET COLL. The gene defective in anhidrotic ectodermal dysplasia is expressed in the developing epithelium, neuroectoderm, thymus, and bone. *J Histochem Cytochem* 1998; 46 : 281-9.
- MORLON A, MUNNICH A, SMAHI A. TAB2, TRAF6 and TAK1 are involved in NF-kappaB activation induced by the TNF-receptor, Edar and its adaptor Edaradd. *Hum Mol Genet* 2005; 14 : 3751-7.
- MORNET E. Hypophosphatasia Orphanet *J Rare Dis* 2007; 2 : 40.
- MORTIER K, WACKENS G. Ectodermal dysplasia syndrome. *Orphanet Encyclopedia*, 2004
- MOTIL K, FETE T, FRALEY J, SCHULTZ R, FOY T, OCHS U ET COLL. Growth characteristics of children with ectodermal dysplasia syndromes. *Pediatr* 2005; 116 : 229-34.



- NA GY, KIM DW, LEE SJ, CHUNG SL, PARK DJ, KIM JC ET COLL. Mutation in the ED1 gene, Ala349Thr, in a Korean patient with X-linked hypohidrotic ectodermal dysplasia developing de novo. *Pediatr Dermatol* 2004; 21 : 568-572.
- NAITO A, YOSHIDA H, NISHIOKA E, SATOH M, AZUMA S, YAMAMOTO T, ET COLL. TRAF6-deficient mice display hypohidrotic ectodermal dysplasia. *Proc Natl Acad Sci* 2002; 99 : 8766-71.
- NEUBÜSER A, PETERS H, BALLING R, MARTIN GR. Antagonistic interactions between FGF and BMP signaling pathways : a mechanism for positioning the sites of tooth formation. *Cell* 1997; 90 : 247-55
- NIE X, LUUKKO K, KETTUNEN P. FGF signalling in craniofacial development and developmental disorders. *Oral Dis* 12 : 102-111.
- NIEHUES T, REICHENBACH J, NEUBERT J, GUDOWIUS S, PUEL A, HORNEFF G, ET COLL. Nuclear factor kappaB essential modulator-deficient child with immunodeficiency yet without anhidrotic ectodermal dysplasia. *J Allergy Clin Immunol* 2004; 4 : 1456-62
- NIEMINEN P, ARTE S, TANNER D, PAULIN L, ALALUUSUA S, THESLEFF I ET COLL. Identification of a nonsense mutation in the PAX9 gene in molar oligodontia. *Eur J Hum Genet* 2001; 9 : 743-746.
- NISHIBU A, HASHIGUCHI T, YOTSUMOTO S, TAKAHASHI M, NAKAMURA K, KANZAKI T ET COLL. Frameshift mutation of the ED1 gene in sibling cases with X-linked hypohidrotic ectodermal dysplasia. *Dermatology* 2003; 207 : 178-81.
- NORAMLY S, FREEMAN A, MORGAN BA. Beta-catenin signaling can initiate feather bud development. *Development* 1999; 126 : 3509-21.
- NORDGARDEN H, JENSEN JL, STORHAUG K. Oligodontia is associated with extra-oral ectodermal symptoms and low whole salivary flow rates. *Oral Dis* 2001; 7 : 226-32.
- NORDGARDEN H, REINTOFT I, NOLTING D, FISCHER-HANSEN, KJAER I. Craniofacial tissues including tooth buds in fetal hypohidrotic ectodermal dysplasia. *Oral Dis* 2001; 7 : 163-70.
- NORTON MR, GAMBLE C. Bone classification : an objective scale of bone density using the computerized tomography scan. *Clin Oral Impl Res* 2001; 12 : 79-84
- OGAWA T, KAPADIA H, FENG JQ, RAGHOW R, PETERS H, D'SOUZA RN. Functional consequences of interactions between Pax9 and Msx1 genes in normal and abnormal tooth development. *J Biol Chem* 2006; 281 : 18363-9.
- OGINO Y, AYUKAWA Y, KUKITA T, ATSUTA I, KOYANO K. Platelet-rich plasma suppresses osteoclastogenesis by promoting the secretion of osteoprotegerin. *J Periodontal Res* 2008 (in press).
- OHAZAMA A, COURTNEY JM, TUCKER AS, NAITO A, TANAKA S, INOUE J, ET COLL. Traf6 is essential for murine tooth cusp morphogenesis. *Dev Dyn* 2004; 229 : 131-5.
- OHTA S, HIRAKI Y, SHIGENO C, SUZUKI F, KASAI R, IKEDA T, KOHNO H ET COLL. Bone morphogenetic proteins (BMP-2 and BMP-3) induce the late phase expression of the prot-oncogene c-fos in murine osteoblastic MC3T3-E1 cells. *FEBS Lett* 1992; 314 : 356-60
- OZEKI H, KURIHARA Y, TONAMI K, WATATANI S, KURIHARA H. Endothelin-1 regulates the dorsoventral branchial arch patterning in mice. *Mech Dev* 2004; 121 : 387-95.
- PÄÄKKÖNEN K, CAMBIAGHI S, NOVELLI G, OUZTS LV, PENTTINEN M, KERE J ET COLL. The mutation spectrum of the EDA gene in X-linked anhidrotic ectodermal dysplasia. *Hum Mutat* 2001; 7 : 349.
- PARK HS, LEE YJ, JEONG SH, KWON TG. Density of the alveolar and basal bones of the maxilla and the mandible. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 2008; 133 : 30-7.

- PERIAGO DR, SCARFE WC, MOSHIRI M, SCHEETZ JP, SILVEIRA AM, FARMAN AG. Linear accuracy and reliability of cone beam CT derived 3-dimensional images constructed using an orthodontic volumetric rendering program. *Angle Orthod* 2008; 78 : 387-95
- PETERKOVÁ R, KRISTENOVÁ P, LESOT H, LISI S, VONESCH JL, GENDRAULT JL, ET COLL. Different morphotypes of the tabby (EDA) dentition in the mouse mandible result from a defect in the mesio-distal segmentation of dental epithelium. *Orthod Craniofac Res* 2002; 5 : 215-26.
- PETERKOVÁ R, LESOT H, VIRIOT L, PETERKA M. The supernumerary cheek tooth in tabby/EDA mice—a reminiscence of the premolar in mouse ancestors. *Arch Oral Biol* 2005; 50 : 219-25.
- PIBOUIN L, BLIN C, HOTTON D, MORRO N, BERDAL A, LEZOT F. Implication des gènes des familles Msx et Dlx lors de la biominéralisation dentaire. *Les cahiers de l'ADF* 2002; 12-13 : 4-9.
- PINHEIRO M, FREIRE-MAIA N. Ectodermal dysplasias : a clinical classification and a causal review. *Am J Med Genet* 1994; 53 : 153-62.
- PISPA J, JUNG HS, JERNVALL J, KETTUNEN P, MUSTONEN T, TABATA MJ ET COLL. Cusp patterning defect in Tabby mouse teeth and its partial rescue by FGF. *Dev Biol* 1999; 216 : 521-34.
- PISPA J, MUSTONEN T, MIKKOLA ML, KANGAS AT, KOPPINEN P, LUKINMAA PL ET COLL. Tooth patterning and enamel formation can be manipulated by misexpression of TNF receptor Edar. *Dev Dyn* 2004; 231 : 432-40.
- PRAGER TM, FINKE C, MIETHKE RR. Dental findings in patients with ectodermal dysplasia. *J Orofac Orthop* 2006; 67 : 347-55.
- PRIOLO M, LAGANA C. Ectodermal dysplasias : a new clinical-genetic classification. *J Med Genet* 2001; 38 : 579-85.
- PUMMILA M, FLINIAUX I, JAATINEN R, JAMES MJ, LAURIKKALA J, SCHNEIDER P ET COLL. Ectodysplasin has a dual role in ectodermal organogenesis : inhibition of Bmp activity and induction of Shh expression. *Development* 2007; 134 : 117-25.
- RAIBLE DW. Development of the neural crest : achieving specificity in regulatory pathways. *Curr Opin Cell Biol* 2006; 18 : 698-703.
- RAMADEVI AR, REDDY EC, RANJAN S, BASHYAM MD. Molecular genetic analysis of patients from India with hypohidrotic ectodermal dysplasia reveals novel mutations in the EDA and EDAR genes. *Br J Dermatol* 2008; 158 : 163-7.
- RAMAESH T, BARD JB. The growth and morphogenesis of the early mouse mandible : a quantitative analysis. *J Anat* 2003; 203:213-22
- RAMIREZ-YANEZ GO, SMID JR, YOUNG WG, WATERS MJ. Influence of growth hormone on the craniofacial complex of transgenic mice. *Eur J Orthod* 2005; 27 : 494-500.
- RAMOS C, ROBERT B. Msh/Msx gene family in neural development. *Trends Genet* 2005; 21 : 624-32.
- REDDY SV. Regulatory mechanisms operative in osteoclasts. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr.* 2004; 14 : 255-70.
- RIOLO ML. An atlas of craniofacial growth. *Michigan : Center for Human Growth and Development* 1974; 379 p.
- RISNES S, PETERKOVA R, LESOT H. Distribution and structure of dental enamel in incisors of Tabby mice. *Arch Oral Biol* 2005; 50 : 181-4.
- ROBLING AG, CASTILLO AB, TURNER CH. Biomechanical and molecular regulation of bone remodeling. *Annu Rev Biomed Eng* 2006; 8:455-98

- RUHIN B, MARTINOT V, LAFFORGUE P, CATTEAU B, MANOUVRIER-HANU S, FERRI J. Pure ectodermal dysplasia : retrospective study of 16 cases and literature review. *Cleft Palate Craniofac J* 2001; 38 : 504-18.
- RUHLI FJ, KUHN G, EIVSON R, MULLER R, SCHULTZ M. Diagnostic value of micro-CT in comparison with histology in the qualitative assessment of historical human skull bone pathologies. *Am J Phys Anthropol* 2007; 133:1099-111
- SAHAKITRUNGRUANG T, WACHARASINDHU S, SUPORNILCHAI V, SRIVUTHANA S, KINGPETCH K. Bone mineral density and body composition in prepubertal and adolescent patients with the classical form of 21-hydroxylase deficiency. *J Med Assoc Thai* 2008 01:705-10
- SAID F, GHOUL-MAZGAR S, RUHIN B, ABDELLAOUI M, CHLAGHMIA F, SAFTA S, ET COLL. Mandibular bone alterations of ovariectomized rats under vitamin D insufficiency. *Histol Histopathol* 2008; 23 : 479-85
- SAKAKURA Y, TSURUGA E, IRIE K, HOSOKAWA Y, NAKAMURA H, YAJIMA T. Immunolocalization of receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand (RANKL) and osteoprotegerin (OPG) in Meckel's cartilage compared with developing endochondral bones in mice. *J Anat* 2005; 207 : 325-37.
- SAKSENA SS, BIXLER D. Facial morphometrics in the identification of gene carriers of X-linked hypohidrotic ectodermal dysplasia. *Am J Med Genet* 1990; 35 : 105-11.
- SASAKI T, ITO Y, BRINGAS P, CHOU S, MARK U, SLAVKIN H ET COLL. TGF $\beta$ -mediated FGF signaling is crucial for regulating cranial neural crest cell proliferation during frontal bone development. *Development* 2006; 133 : 371-81.
- SCHMIDT-ULLRICH R, TOBIN DJ, LENHARD D, SCHNEIDER P, PAUS R, SCHEIDEREIT C. NF-kappaB transmits Eda A1/EdaR signalling to activate Shh and cyclin D1 expression, and controls post-initiation hair placode down growth. *Development* 2006; 133 : 1045-57.
- SCHUBERT A, SCHULZ H, EMONS G, GRÜNDKER C. Expression of osteoprotegerin and receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand (RANKL) in HCC70 breast cancer cells and effects of treatment with gonadotropin-releasing hormone on RANKL expression. *Gynecol Endocrinol* 2008; 24:331-8
- SCHWADERER AL, CRONIN R, MAHAN JD, BATES CM. Low bone density in children with hypercalciuria and/or nephrolithiasis. *Pediatr Nephrol* 2008 (in press)
- SMITH RN, ELCOCK C, ABDELLATIF A, BÄCKMAN B, RUSSELL JM, BROOK AH. Enamel defects in extracted and exfoliated teeth from patients with amelogenesis imperfecta, measured using the extended enamel defects index and image analysis. *Arch Oral Biol* 2008 (in press)
- SCHNEIDER P, STREET SL, GAIDE O, HERTIG S, TARDIVEL A, TSCHOPP J ET COLL. Mutations leading to X-linked hypohidrotic ectodermal dysplasia affect three major functional domains in the tumor necrosis factor family member ectodysplasin-A. *J Biol Chem* 2001; 276 : 18819-27.
- SETTINERI WM, SALZANO FM, FRETAS MJ. X-linked anhidrotic ectodermal dysplasia with some unusual features. *J Med Genet.* 1976; 13 : 212-6.
- SHIGETANI Y, NOBUSADA Y, KURATANI S. Ectodermally derived FGF8 defines the maxillomandibular region in the early chick embryo : epithelial-mesenchymal interactions in the specification of the craniofacial mesenchyme. *Dev Biol* 2000; 228 : 73-85.
- SINHA SK, ZACHARIAH S, QUIÑONES HI, SHINDO M, CHAUDHARY PM. Role of TRAF3 and -6 in the activation of the NF-kappa B and JNK pathways by X-linked ectodermal dysplasia receptor. *J Biol Chem* 2002; 277 : 44953-61.
- SKRINJARIĆ I, SKRINJARIĆ K, VRANIĆ DN, MAJSTOROVIĆ M, GLAVINA D. Craniofacial anthropometric pattern profile in hypohidrotic ectodermal dysplasia-application in detection of gene carriers. *Coll Anthropol* 2003; 27 : 753-759.
- SMAHI A, COURTOIS G, RABIA SH, DOFFINGER R, BODEMER C, MUNNICH A ET COLL. The NF-kappaB signalling pathway in human diseases : from incontinentia pigmenti to ectodermal dysplasias and immune-deficiency syndromes. *Hum Mol Genet* 2002; 11 : 2371-5.

- SNAPPER CM, ROSAS FR, ZELAZOWSKI P, MOORMAN MA, KEHRY MR, BRAVO R, ET COLL. B cells lacking RelB are defective in proliferative responses, but undergo normal B cell maturation to Ig secretion and Ig class switching. *J Exp Med* 1996; 184 : 1537-41.
- SÖDERHOLM AL, KAITILA I. Expression of X-linked hypohidrotic ectodermal dysplasia in six males and in their mothers. *Clin Genet* 1985; 28 : 136-44.
- SOFAER JA. A dental approach to carrier screening in X linked hypohidrotic ectodermal dysplasia. *J Med Genet* 1981; 18 : 459-460.
- SOFAER JA. Aspects of the tabby-crinkled-downless syndrome. I. The development of tabby teeth. *J Embryol Exp Morphol* 1969; 22 : 181-205.
- SORIANO P, MONTGOMERY C, GESKE R, BRADLEY A. Targeted disruption of the c-src proto-oncogene leads to osteopetrosis in mice. *Cell* 1991; 64 : 693-702.
- SRIVASTAVA A, DURMOMWICZ M, HARTUNG A, HUDSON J, OUZTS L, DONOVAN D ET COLL. Ectodysplasin-A1 is sufficient to rescue both hair growth and sweat glands in Tabby mice. *Hum Mol Genet* 2001; 10 : 2973-81.
- SRIVASTAVA AK, PISPA J, HARTUNG AJ, DU Y, EZER S, JENKS T, ET COLL. The Tabby phenotype is caused by mutation in a mouse homologue of the EDA gene that reveals novel mouse and human exons and encodes a protein (ectodysplasin-A) with collagenous domains *Proc Natl Acad Sci* 1997; 94 : 13069-74
- STANFORD CM, GUCKES A, FETE M, SRUN S, RICHTER MK. Perceptions of outcomes of implant therapy in patients with ectodermal dysplasia syndroms. *Int J Prosthodont* 2008; 21 : 195-200
- SWEENEY IP, FERGUSON JW, HEGGIE AA, LUCAS JO. Treatment outcomes for adolescent ectodermal dysplasia patients treated with dental implants. *Int J Paediatr Dent* 2005; 15 : 241-8.
- TAKAESU G, KISHIDA S, HIYAMA A, YAMAGUCHI K, SHIBUYA H, IRIE K, ET COLL. TAB2, a novel adaptor protein, mediates activation of TAK1 MAPKKK by linking TAK1 to TRAF6 in the IL-1 signal transduction pathway. *Mol Cell* 2000; 5 : 649-58.
- TARIQ M, WASIF N, AHMAD W. A novel deletion mutation in the EDAR gene in a Pakistani family with autosomal recessive hypohidrotic ectodermal dysplasia. *Br J Dermatol* 2007; 157 : 207-9.
- TARIQ M, WASIF N, AYUB M, AHMAD W. A novel 4-bp insertion in EDA1 gene in a Pakistani family with X-linked hypohidrotic ectodermal dysplasia. *Eur J Dermatol* 2007; 17 : 209-212.
- TARJAN I, GABRIS K, ROZSA N. Early prosthetic treatment of patients with ectodermal dysplasia : a clinical report. *J Prosthet Dent* 2005; 93 : 419-24.
- TARPEY P, PEMBERTON TJ, STOCKTON DW, DAS P, NINIS V, EDKINS S, ET COLL. A novel Gln358Glu mutation in ectodysplasin A associated with X-linked dominant incisor hypodontia *Am J Med Genet A* 2007; 143 : 390-4.
- TAUCHMANOVA L, PIVONELLO R, DE MARTINO MC, RUSCIANO A, DE LEO M, RUOSI C ET COLL. Effects of sex steroids on bone in women with subclinical or overt endogenous hypercortisolism. *Eur J Endocrinol* 2007; 157:359-66
- THEOLEYRE S, WITTRANT Y, TAT SK, FORTUN Y, REDINI F, HEYMANN D. The molecular triad OPG/RANK/RANKL : involvement in the orchestration of pathophysiological bone remodeling. *Cytokine Growth Factor Rev* 2004; 15 : 457-75.
- THESLEFF I, MIKKOLA ML. Death receptor signaling giving life to ectodermal organs. *Sci STKE*. 2002; 2002 : PE22
- THESLEFF I. Genetic basis of tooth development and dental defects. *Acta Odontol Scand* 2000; 58 : 191-4.

- THESLEFF I. The genetic basis of tooth development and dental defects. *Am J Med Genet A* 2006; 140:2530-5
- THOMAS BL, SHARPE PT. Patterning of the murine dentition by homeobox genes. *Eur J Oral Sci* 1998; 106 : 48-54.
- TOKIMASA C, KAWATA T, FUJITA T, KAKU M, KOHNO S, TSUTSUI K ET COLL. Effects of insulin-like growth factor-I on the expression of osteoclasts and osteoblasts in the nasopremaxillary suture under different masticatory loading conditions in growing mice. *Arch Oral Biol* 2003; 48:31-8
- TRIBULO C, AYBAR M, NGUYEN V, MULLINS M, MAYOR R. Regulation of Msx genes by a BMP gradient is essential for neural crest specification. *Dev* 2003; 130 : 6441-52.
- TRUMPP A, DEPEW MJ, RUBENSTEIN JL, BISHOP JM, MARTIN GR. Cre-mediated gene inactivation demonstrates that FGF8 is required for cell survival and patterning of the first branchial arch. *Genes Dev* 1999;13 : 3136-48.
- TUCKER AS, AL KHAMIS A, SHARPE PT. Interactions between Bmp-4 and Msx-1 act to restrict gene expression to odontogenic mesenchyme. *Dev Dyn* 1998; 212 : 533-9.
- TUCKER AS, HEADON DJ, COURTNEY JM, OVERBEEK P, SHARPE PT. The activation level of the TNF family receptor, Edar, determines cusp number and tooth number during tooth development. *Dev Biol* 2004; 268 : 185-94.
- TUCKER AS, HEADON DJ, SCHNEIDER P, FERGUSON BM, OVERBEEK P, TSCHOPP J ET COLL. Edar/Eda interactions regulate enamel knot formation in tooth morphogenesis. *Development* 2000; 127 : 4691-700.
- TUMMERS M, THESLEFF I. Observations on continuously growing roots of the sloth and the K14-Eda transgenic mice indicate that epithelial stem cells can give rise to both the ameloblast and root epithelium cell lineage creating distinct tooth patterns. *Evol Dev* 2008; 10 : 187-95.
- TURKYILMAZ I, TÖZÜM TF, TUMER C. Bone density assessments of oral implant sites using computerized tomography. *J Oral Rehabil* 2007; 34 : 267-72.
- UMBERTO G, MAIORANA C, GHIGLIONE V, MARZO G, SANTORO F, SZABO G. Osseointegration and guided bone regeneration in ectodermal dysplasia. *J Craniofac Surg* 2007; 18 : 1296-04.
- VALCUENDE-CAVERO F, MARTINEZ F, PÉREZ-PASTOR G, OLTRA S, FERRER I, TOMÁS-CABEDO G, ET COLL. Autosomal-dominant hypohidrotic ectodermal dysplasia caused by a novel mutation. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2008; 1.
- VAN DER HOUT AH, OUDESLOUJS GG, VENEMA A, VERHEIJ JB, MOL BG, RUMP B, ET COLL. Mutation screening of the Ectodysplasin-A receptor gene EDAR in hypohidrotic ectodermal dysplasia. *Eur J Hum Genet* 2008
- VAN ERUM R, MULIER M, CARELS C, VERBEKE G, DE ZEGHER F. Craniofacial growth in short children born small for gestational age : effects of growth hormone treatment. *J Dent Res* 1997; 76 : 1570-86.
- VARGAS GA, FANTINO E, GEORGE-NASCIMENTO C, GARGUS JJ, HAIGLER HT. Reduced epidermal growth factor receptor expression in hypohidrotic ectodermal dysplasia and Tabby mice. *J Clin Invest* 1996; 97 : 2426-32.
- VASTARDIS H, KARIMBUX N, GUTHUA SW, SEIDMAN JG, SEIDMAN CE. A human MSX1 homeodomain missense mutation causes selective tooth agenesis. *Nat Genet* 1996; 13 : 417-21.
- VERDELIS K, LING Y, SREENATH T, HARUYAMA N, MACDOUGALL M, VAN DER MEULEN MC ET COLL. DSPP effects on in vivo bone mineralization. *Bone* 2008 (in press)
- VIERUCCI S, BACCETTI T, TOLLARO I. Dental and craniofacial findings in hypohidrotic ectodermal dysplasia during the primary dentition phase. *J Clin Pediatr Dent* 1994; 18 : 291-7.

- VINCENT MC, BIANCALANA V, GINISTY D, MANDEL JL, CALVAS P. Mutational spectrum of the ED1 in X-linked hypohidrotic ectodermal dysplasia. *Eur J Hum Genet* 2001; 9 : 355-63.
- VINOLO E, SEBBAN H, CHAFFOTE A, ISRAËL A, COURTOIS G, VERON M ET COLL. A point mutation in NEMO associated with anhidrotic ectodermal dysplasia with immunodeficiency pathology results in destabilization of the oligomer and reduced lipopolysaccharide and Tumor Necrosis Factor mediated NF-kappa B activation. *J Biol Chem* 2006; 281 : 6334-48.
- VISINONI AF, DE SOUZA RL, FREIRE-MAIA N, GOLLOP TR, CHAUTARD-FREIRE-MAIA EA. X-linked hypohidrotic ectodermal dysplasia mutations in Brazilian families. *Am J Med Genet A* 2003; 122 : 51-5.
- WALKER CG, ITO Y, DANGARIA S, LUAN X, DIEKWISCH TG. RANKL, osteopontin, and osteoclast homeostasis in a hyperocclusion mouse model. *Eur J Oral Sci* 2008; 116 : 312-8
- WHYTE MP. Paget's disease of bone and genetic disorders of RANKL/OPG/RANK/NF-kappaB signaling. *Ann N Y Acad Sci* 2006; 1068 : 143-64.
- WIREN KM, SEMIRALE AA, ZHANG XW, WOO A, TOMMASINI SM, PRICE C ET COLL. Targeting of androgen receptor in bone reveals a lack of androgen anabolic action and inhibition of osteogenesis : a model for compartment-specific androgen action in the skeleton. *Bone* 2008, 43 : 440-51
- WRIGHT JT, HART TC, HART PS, SIMMONS D, SUGGS C, DALEY B, SIMMER J ET COLL. Human and mouse enamel phenotypes resulting from mutation or altered expression of AMEL, ENAM, MMP20 and KLK4. *Cells Tissues Organs* 2008 (in press)
- YAN M, WANG LC, HYMOWITZ SG, SCHILBACH S, LEE J, GODDARD A ET COLL. Two-amino acid molecular switch in an epithelial morphogen that regulates binding to two distinct receptors. *Science* 2000; 290:523-7
- YAVUZ I, BASKAN Z, ULKU R, DULGERGIL TC, DARI O, ECE A ET COLL. Ectodermal dysplasia : Retrospective study of fifteen cases. *Arch Med Res* 2006; 37 : 403-9.
- ZHANG Y, FENG J, SHEN B. Identification of binding epitope of a monoclonal antibody (212) against human TNF-alpha using computer modeling and deletion mutant technique. *Sci China C Life Sci* 2004; 47:279-86
- ZHANG Y, WANG S, SONG Y, HAN J, CHAI Y, CHEN Y. Timing of odontogenic neural crest cell migration and tooth-forming capability in mice. *Dev Dyn* 2003; 226 : 713-8.
- ZHANG YH, HEULSMANN A, TONDRABI MM, MUKHERJEE A, ABU-AMER Y. Tumor necrosis factor-alpha (TNF) stimulates RANKL-induced osteoclastogenesis via coupling of TNF type 1 receptor and RANK signaling pathways. *J Biol Chem* 2001; 276 : 563-8.
- ZIOLKOWSKA A, RUCINSKI M, PUCHERS A, TORTORELLA C, NUSSDORFER GG, MALENDOWICZ LK. Expression of osteoblast marker genes in rat calvarial osteoblast-like cells, and effects of the endocrine disruptors diphenylopropane, beznophenone-3, resveratrol and silymarin. *Chem Biol Interact* 2006; 164 : 147-57
- ZOU CC, ZHAO ZY. Clinical and molecular analysis of NF-kappaB essential modulator in Chinese incontinentia pigmenti patients. *Int J Dermatol* 2007; 4610 : 1017-22.

*Signalement bibliographique ajouté par le :*

**UNIVERSITÉ DE STRASBOURG**  
**Service Commun de Documentation**

**Les dysplasies ectodermiques : présentation du syndrome, des prises en charge thérapeutiques et des orientations de recherche**

François CLAUSS

**Le Chirurgien Dentiste de France, 3 Novembre 2005, n° 1231, pages 25-29**

**Annexe 1 :**

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

La version imprimée de cette thèse peut être consultée à la bibliothèque ou dans un autre établissement via une demande de prêt entre bibliothèques (PEB) auprès de nos services :

<http://www-sicd.u-strasbg.fr/services/peb/>

## **ANNEXE 2**

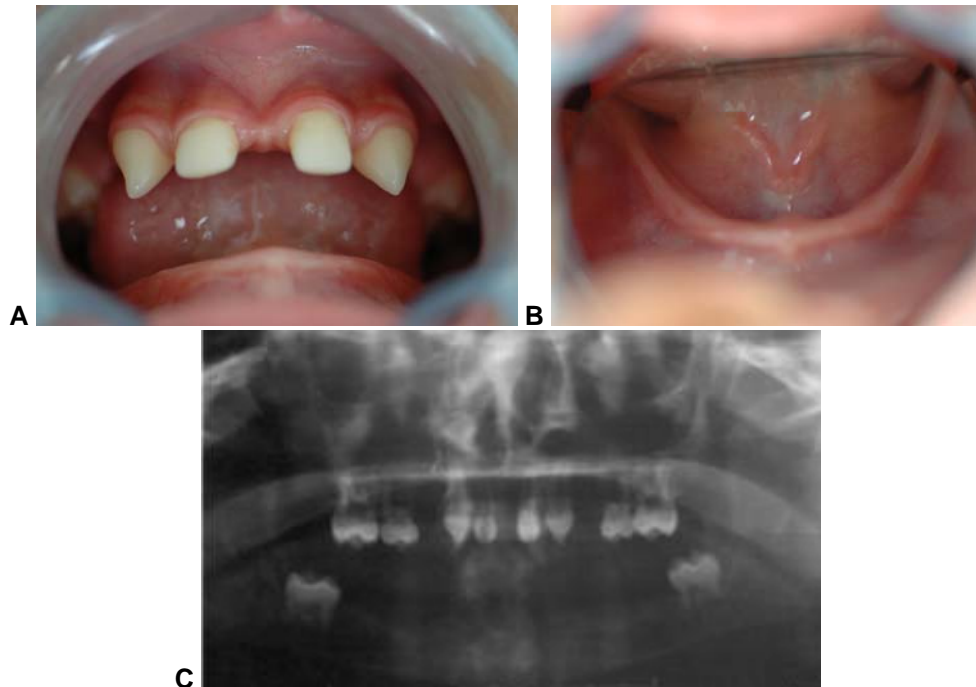
### **PHENOTYPES DENTAIRES DES PATIENTS DEX ET DEH AUTOSOMIQUE**

---



**PHENOTYPES DENTAIRES DES PATIENTS PRESENTANT UNE MUTATION FAUX-SENS DE L'EXON 2 DU GENE *EDA* AVEC ALTERATION DU SITE DE CLIVAGE PROTEOLYTIQUE FURINE-DEPENDANT**

**Patient 1**



**Fig :** Vues cliniques endo-buccales (A et B) et orthopantomogramme (C) du patient 1 porteur de la mutation faux-sens (465 C >T) de l'exon 2 du gène *EDA* responsable de la modification protéique p. Arg155 Cys.

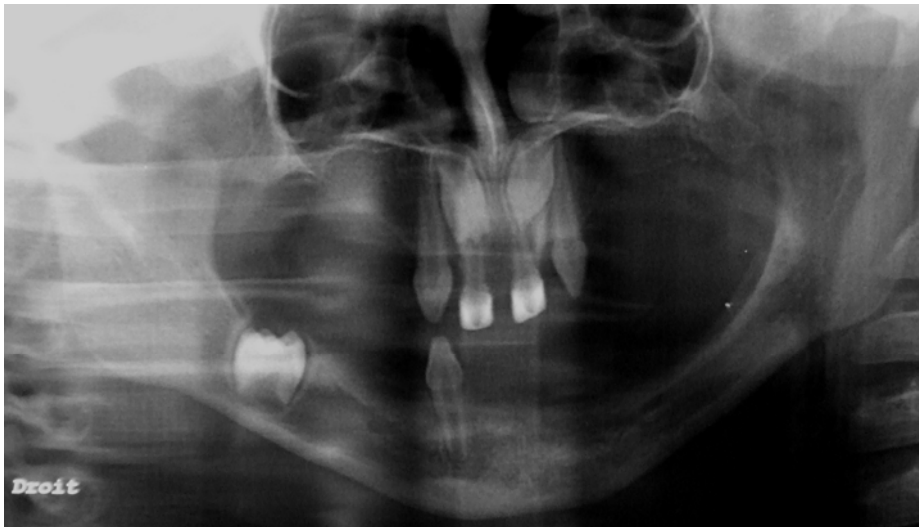
Phénotype		Nombre d'agénésies				
		Incisives centrales	Incisives latérales	Canines	Prémolaires	Molaires
En denture temporaire	maxillaire	0	2	0		2
	mandibulaire	2	2	2		4
En denture permanente	maxillaire	0	2	2	4	2
	mandibulaire	2	2	2	4	2

**Tableau :** Distribution topographique des agénésies dentaires du patient 1.

**Phénotype dentaire :**

- En denture temporaire : Hypodontie maxillaire (4 agénésies) et phénotype sévère d'anodontie mandibulaire.
- En denture permanente : Oligodontie maxillaire (10 agénésies) et oligodontie sévère mandibulaire (12 agénésies) avec présence uniquement des germes secondes molaires permanentes mandibulaires.

## Patient 2



**Fig :** Orthopantomogramme d'un patient (4 ans ½) porteur d'une mutation par variation nucléotidique c 466 C>T de l'exon 2 du gène *EDA* responsable de la modification protéique p.Arg156cys.

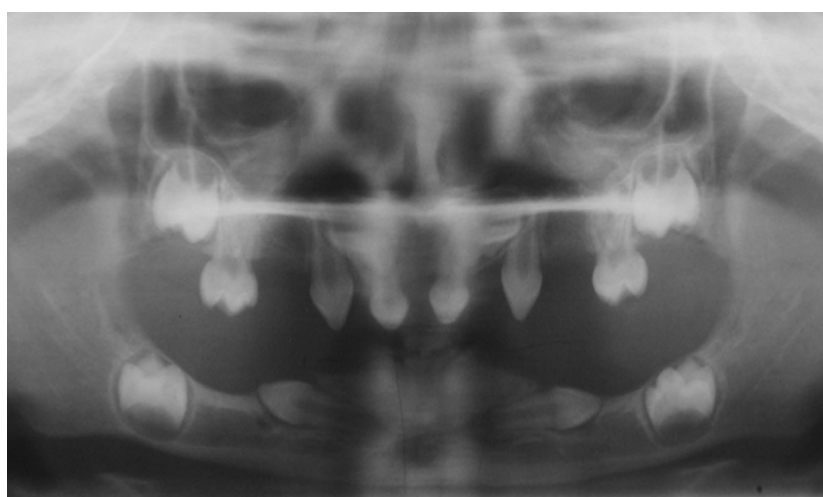
Phénotype		Nombre d'agénésies				
		Incisives centrales	Incisives latérales	Canines	Prémolaires	Molaires
En denture temporaire	maxillaire	0	2	0		4
	mandibulaire	2	2	1		4
En denture permanente	maxillaire	0	2	0	4	4
	mandibulaire	2	2	2	4	3

**Tableau :** Distribution topographique des agénésies dentaires du patient 2.

### Phénotype dentaire :

- En denture temporaire : Phénotype sévère d'oligodontie mandibulaire (9 agénésies avec présence uniquement d'une canine) et maxillaire (6 agénésies). Dymorphies coronaires des incisives centrales maxillaires et des canines temporaires.
- En denture permanente : Oligodontie sévère plus marquée au niveau mandibulaire (13 agénésies avec présence uniquement d'une molaire).

**Patient 3**



**Fig :** Vue clinique endo-buccale (A) et orthopantomogramme (B) du patient 3 porteur d'une mutation faux-sens c.467 G>A de l'exon 2 du gène *EDA* responsable de la variation protéique p.Arg156His.

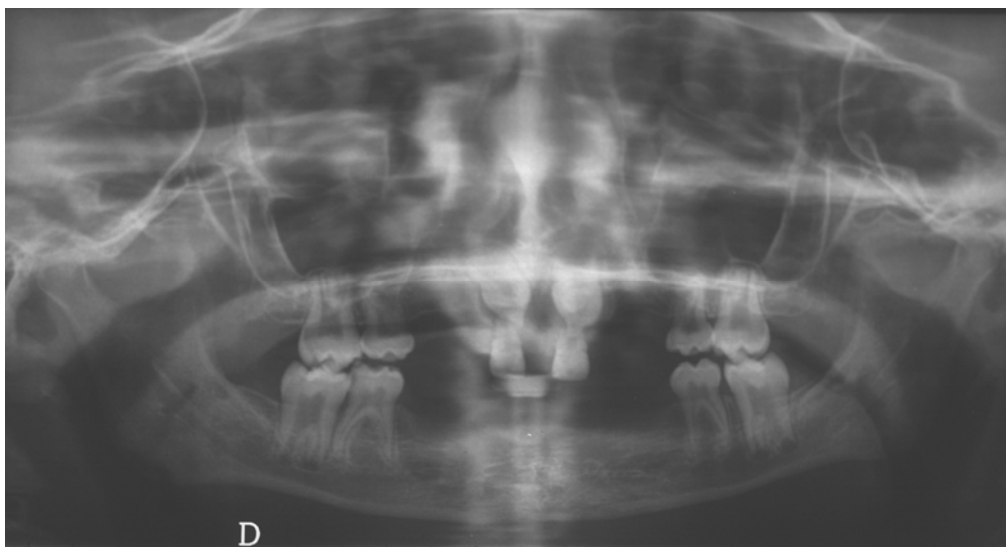
Phénotype		Nombre d'agénésies				
		Incisives centrales	Incisives latérales	Canines	Prémolaires	Molaires
En denture temporaire	maxillaire	0	2	0		2
	mandibulaire	2	2	0		4
En denture permanente	maxillaire	0	2	2	4	2
	mandibulaire	2	2	2	4	2

**Tableau :** Distribution topographique des agénésies du patient 3.

**Phénotype dentaire :**

- En denture temporaire : Phénotype sévère d'oligodontie mandibulaire (8 agénésies avec présence uniquement des canines temporaires) et hypodontie maxillaire modérée (4 agénésies)
- En denture permanente : Oligodontie sévère au niveau mandibulaire (12 agénésies avec présence uniquement des premières molaires) et oligodontie maxillaire (10 agénésies avec présence des incisives centrales et des premières molaires).

### Patient 4



**Fig :** Orthopantomogramme du patient 4 porteur d'une mutation faux-sens c.457 C>T de l'exon 2 du gène *EDA* responsable de la modification protéique pArg153Cys de l'EDA.

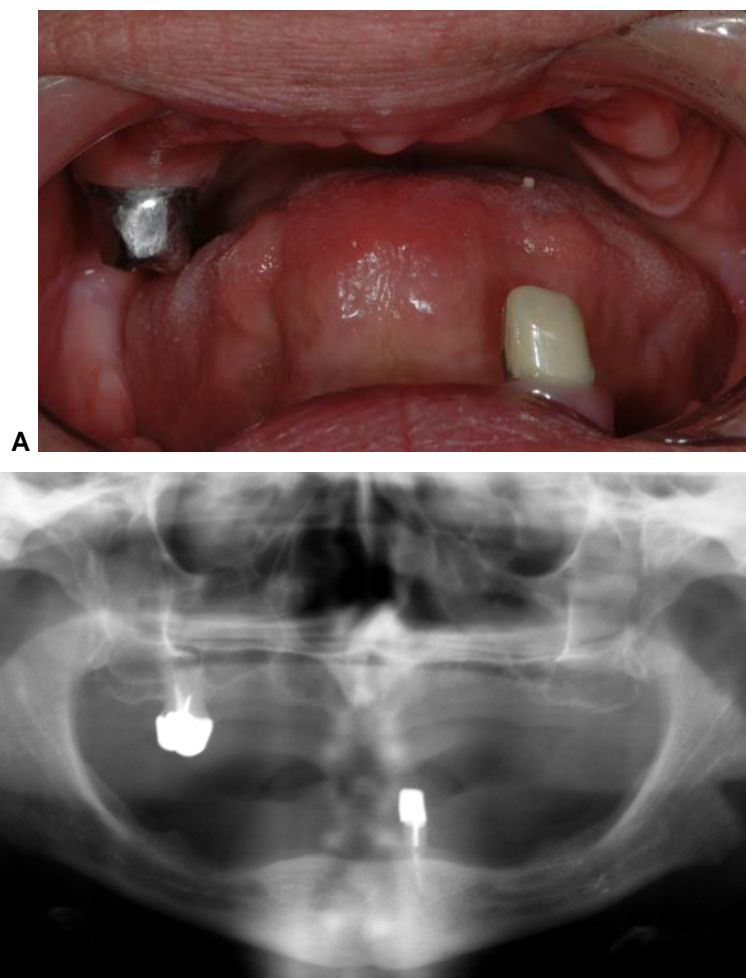
Phénotype		Nombre d'agénésies				
		Incisives centrales	Incisives latérales	Canines	Prémolaires	Molaires
En denture temporaire	maxillaire	0	2	2		2
	mandibulaire	2	2	2		2
En denture permanente	maxillaire	0	2	2	4	2
	mandibulaire	2	2	2	4	2

**Tableau :** Distribution topographique des agénésies du patient 4.

#### Phénotype dentaire :

- En denture temporaire : Phénotype d'oligodontie mandibulaire (8 agénésies avec présence uniquement des secondes molaires temporaires) et maxillaire (6 agénésies)
- En denture permanente : Phénotype d'oligodontie sévère au niveau mandibulaire (12 agénésies avec présence uniquement des premières molaires) et oligodontie maxillaire (10 agénésies avec présence des incisives centrales et des premières molaires).

Patient 5



**Fig :** Vue clinique endo-buccale (A) et orthopantomogramme (B) du patient 5 porteur de la mutation faux-sens c.466C>G de l'exon 2 du gène *EDA* responsable de la modification protéique p.Arg156Gly de l'EDA.

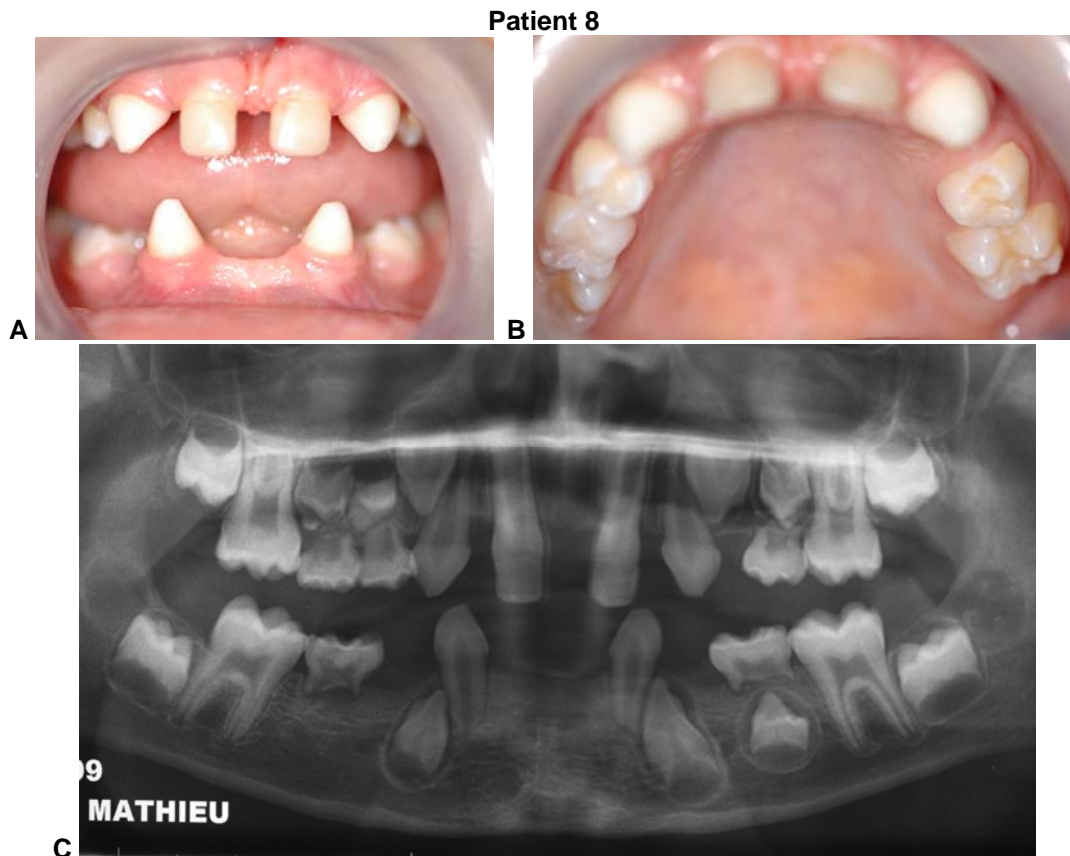
Phénotype		Nombre d'agénésies				
		Incisives centrales	Incisives latérales	Canines	Prémolaires	Molaires
En denture temporaire	maxillaire	ND	ND	ND		ND
	mandibulaire	ND	ND	ND		ND
En denture permanente	maxillaire	2	2	2	4	3
	mandibulaire	2	2	1	4	4

**Tableau :** distribution topographique des agénésies du patient 5.

**Phénotype dentaire :**

- En denture permanente : Phénotype d'oligodontie sévère au niveau mandibulaire (13 agénésies avec présence uniquement d'une canine) et maxillaire (13 agénésies avec présence uniquement d'une molaire).

**PHENOTYPES DENTAIRES DES PATIENTS PRESENTANT UNE MUTATION DES CODONS 6-8 DU GENE *EDA* AVEC ALTERATION DU SITE D'HOMOLOGIE TNF EXTRA-CELLULAIRE DE L'*EDA***



**Fig :** Vues cliniques endo-buccales (A et B) et orthopantomogramme (E) du patient 8 présentant une mutation c.756T>G de l'exon 6 du gène *EDA*.

Phénotype		Nombre d'agénésies				
		Incisivales centrales	Incisivales latérales	Canines	Prémolaires	Molaires
En denture temporaire	maxillaire	ND	ND	0		1
	mandibulaire	2	2	0		2
En denture permanente	maxillaire	0	2	0	1	0
	mandibulaire	2	2	0	3	0

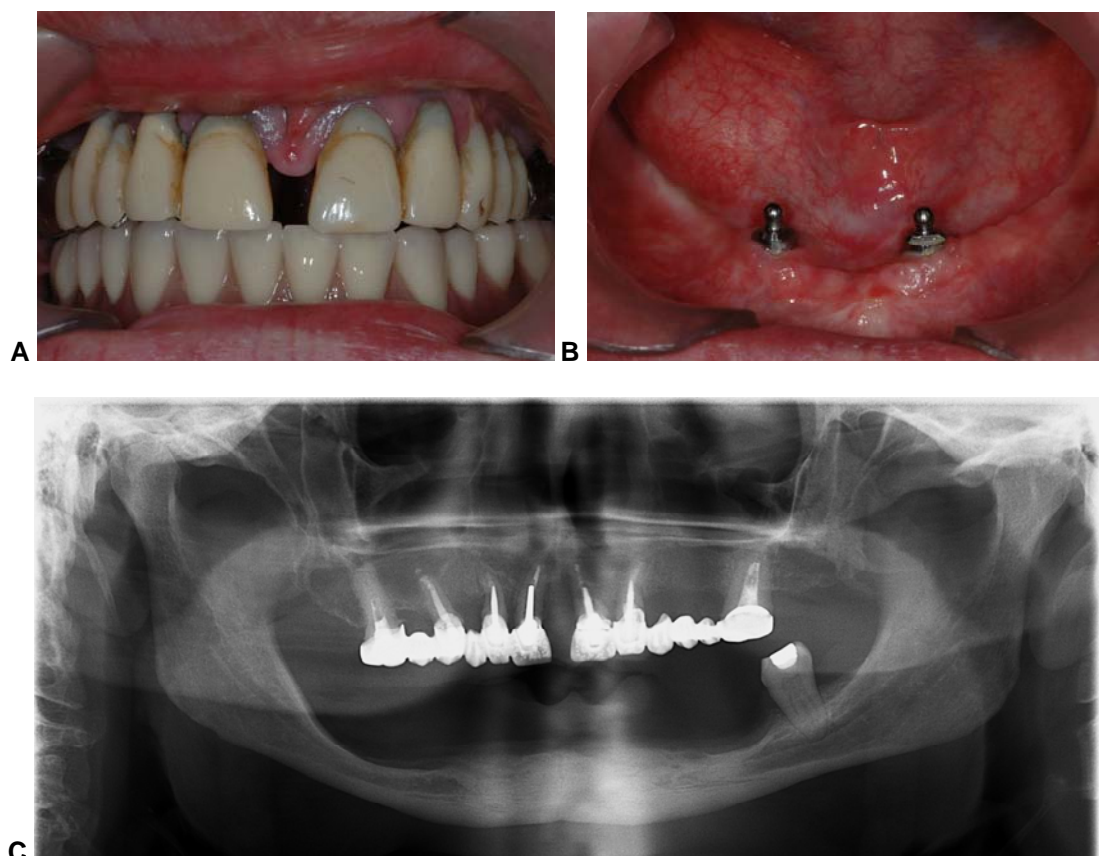
**Tableau :** Distribution topographique des agénésies chez le patient 8.

**Phénotype dentaire :**

- En denture temporaire : Phénotype modéré au niveau maxillaire avec présence de 3 molaires et des canines temporaires. Phénotype d'oligodontie plus sévère au niveau mandibulaire avec agénésies de l'ensemble du bloc incisif et de 2 molaires temporaires. Dysmorphies coronaires des incisives et canines conoïdes.
- En denture permanente : Phénotype d'hypodontie maxillaire et oligodontie mandibulaire modérée.



### Patient 9



**Fig :** Vues cliniques endo-buccales (A et B) et orthopantomogramme (C) du patient 9 porteur d'une mutation faux-sens c.754C>A de l'exon 6 du gène *ED1*.

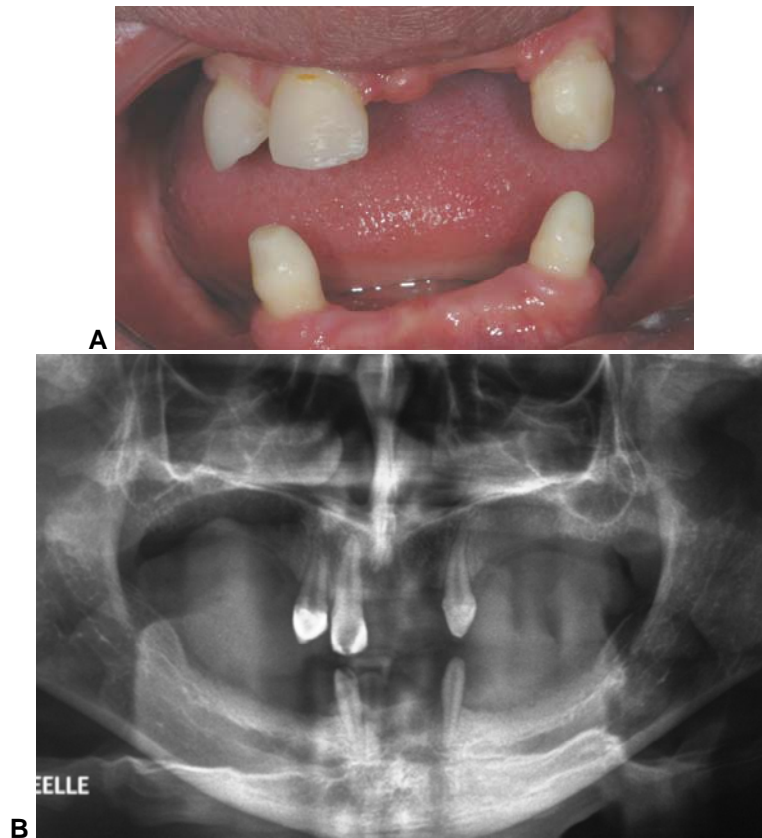
Phénotype	Nombre d'agénésies				
	incisives centrales	incisives latérales	canines	prémolaires	molaires
maxillaire	0	2	0	3	2
mandibulaire	2	2	2	4	3

**Tableau :** Distribution topographique des agénésies dentaires chez le patient 9.

#### Phénotype dentaire :

- En denture permanente : Oligodontie modérée au maxillaire et phénotype particulièrement sévère d'oligodontie au niveau mandibulaire avec présence uniquement d'une molaire mandibulaire gauche.

**Patient 10**



**Fig :** Vue clinique endo-buccale (A) et orthopantomogramme (B) du patient 10 porteur d'une mutation par substitution nucléotidique C871 G>A de l'exon 7 du gène *EDA* responsable de la modification protéique p.G291R.

Phénotype		Nombre d'agénésies				
		Incisives centrales	Incisives latérales	Canines	Prémolaires	Molaires
En denture temporaire	maxillaire	ND	ND	ND		ND
	mandibulaire	ND	ND	ND		ND
En denture permanente	maxillaire	1	2	0	4	4
	mandibulaire	2	2	0	4	4

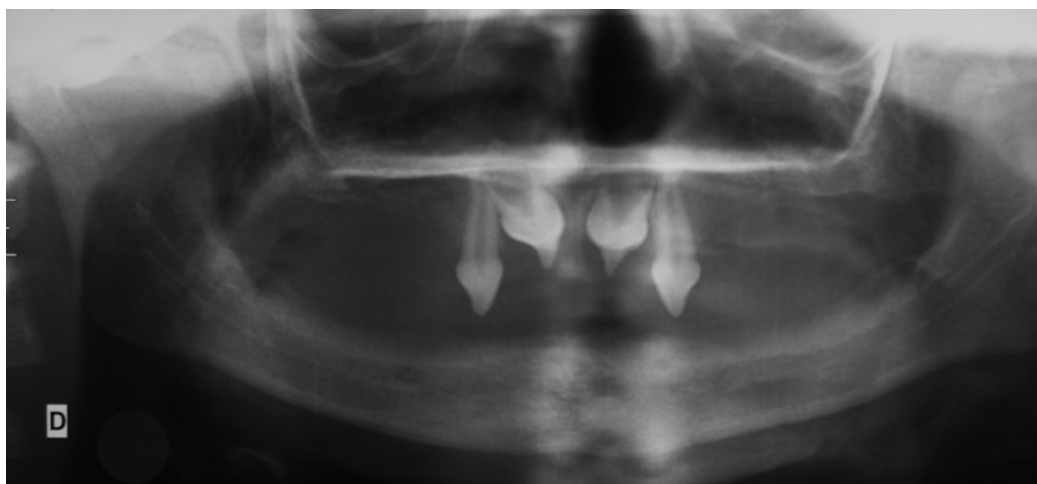
**Tableau :** Distribution topographique des agénésies chez le patient 10.

**Phénotype dentaire :**

- En denture permanente : Oligodontie sévère au maxillaire (11 agénésies) et mandibulaire (12 agénésies avec présence uniquement des canines)



## Patient 11



**Fig :** Orthopantomogramme du patient 11 présentant une mutation faux-sens c.896 G>A de l'exon 7 du gène *EDA* responsable de la modification protéique pGly299Asp.

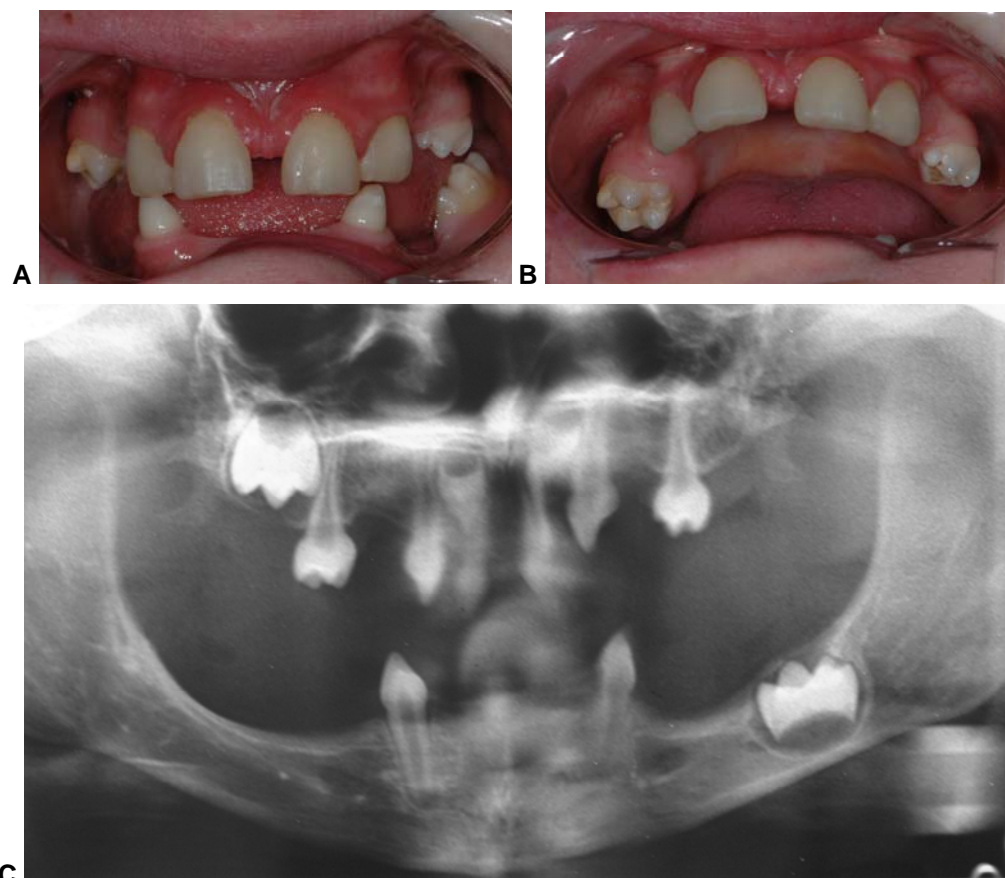
Phénotype		Nombre d'agénésies				
		Incisives centrales	Incisives latérales	Canines	Prémolaires	Molaires
En denture temporaire	maxillaire	2	2	0		4
	mandibulaire	2	2	2		4
En denture permanente	maxillaire	0	2	2	4	4
	mandibulaire	2	2	2	4	4

**Tableau :** Distribution topographique des agénésies du patient 11.

### Phénotype dentaire :

- En denture temporaire : Oligodontie sévère maxillaire avec présence uniquement des canines temporaires dysmorphiques. Phénotype d'anodontie au niveau mandibulaire correspondant au phénotype le plus sévère.
- En denture permanente : Oligodontie au niveau maxillaire avec présence uniquement des germes des incisives centrales dysmorphiques. Anodontie mandibulaire.

### Patient 12



**Fig :** Vues cliniques endo-buccales (A et B) et orthopantomogramme (C) du patient 12 porteur d'une mutation faux-sens c.891 G>C de l'exon 7 du gène *ED1* responsable de la modification protéique pAsp298His.

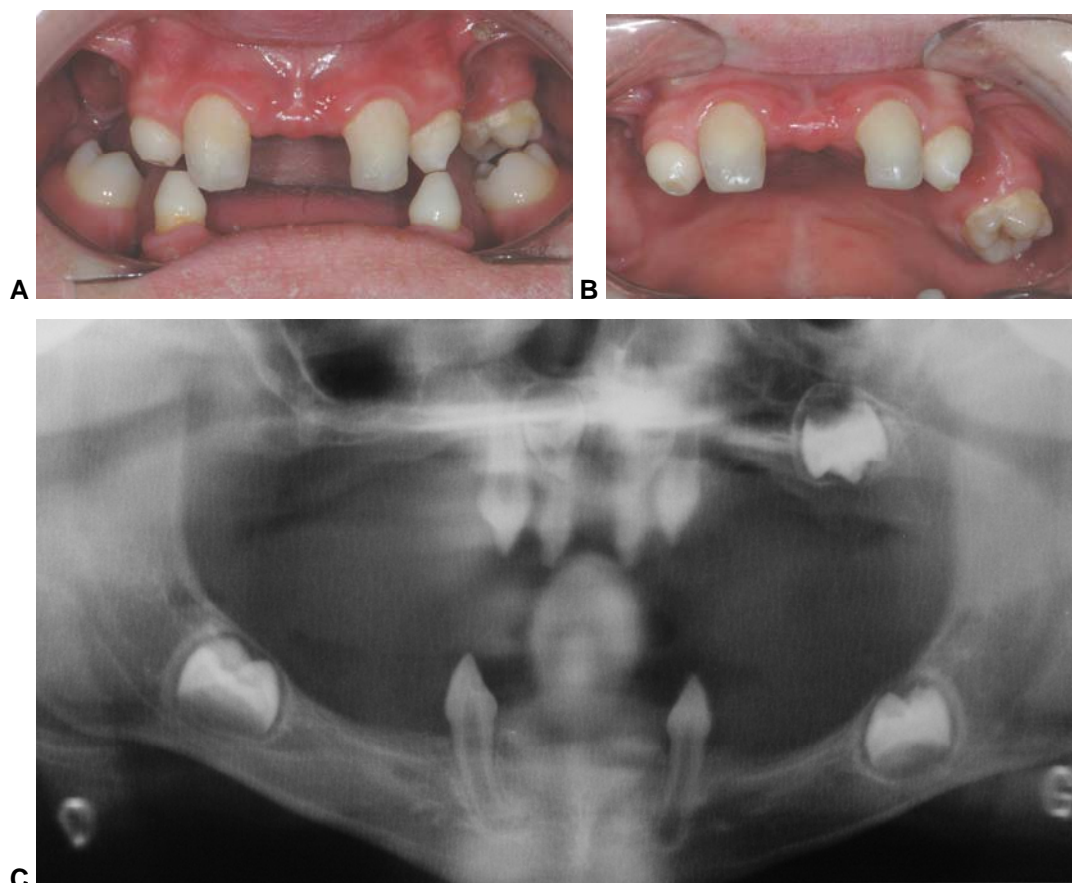
Phénotype		Nombre d'agénésies				
		Incisives centrales	Incisives latérales	Canines	Prémolaires	Molaires
En denture temporaire	maxillaire	0	2	0		2
	mandibulaire	2	2	0		4
En denture permanente	maxillaire	0	2	2	4	3
	mandibulaire	2	2	2	4	3

**Tableau :** Distribution topographique des agénésies du patient 12.

#### Phénotype dentaire :

- En denture temporaire : Hypodontie maxillaire avec agénésies des incisives latérales et des premières molaires (phénotype modéré). Phénotype d'oligodontie au niveau mandibulaire avec présence uniquement des canines. Anomalies morphologiques coronaires au niveau des canines temporaires conoïdes.
- En denture permanente : Oligodontie sévère plus marquée au niveau mandibulaire avec présence uniquement des incisives centrales maxillaires, d'une première molaire mandibulaire et maxillaire. Dysmorphies coronaires des incisives centrales maxillaires et anomalies de la structure et morphologie cuspidiennes de la première molaire maxillaire.

**Patient 13**



**Fig :** Vues cliniques endo-buccales (A et B) et orthopantomogramme (C) du patient 13 (frère du patient 12).

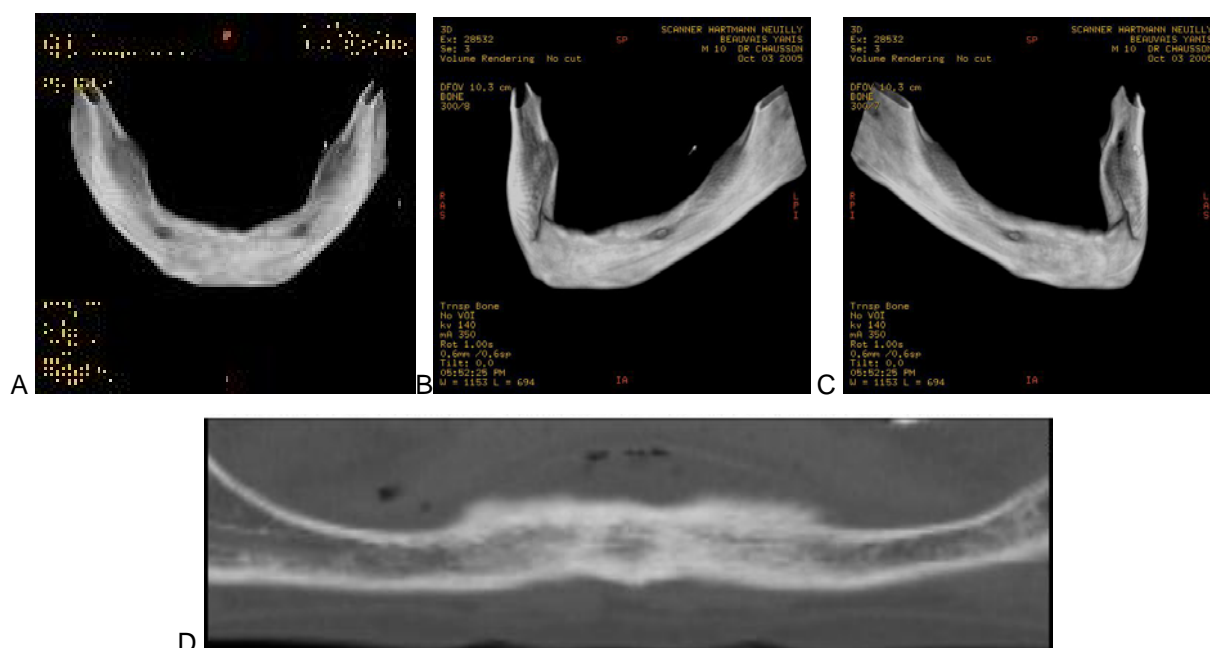
Phénotype		Nombre d'agénésies				
		Incisives centrales	Incisives latérales	Canines	Prémolaires	Molaires
En denture temporaire	maxillaire	0	2	0		4
	mandibulaire	2	2	0		4
En denture permanente	maxillaire	0	2	0	4	3
	mandibulaire	2	2	2	4	2

**Tableau :** Distribution topographique des agénésies du patient 13.

**Phénotype dentaire :**

- En denture temporaire : Phénotype d'oligodontie sévère plus marquée au niveau mandibulaire. Anomalies morphologiques coronaires au niveau des incisives et canines conoïdes.
- En denture permanente : oligodontie sévère au niveau maxillaire (11 agénésies) et mandibulaire (12 agénésies). Dymorphies coronaires des incisives centrales maxillaires et anomalies de la structure et morphologie cuspidiennes de la première molaire maxillaire.

### Patient 14



**Fig :** Reconstructions tridimensionnelles (A, B et C) et coupe frontale mandibulaires (D) du patient 14 porteur d'une mutation faux-sens c.820 T>C de l'exon 7 du gène *EDA* responsable de la modification protéique p.Trp274Arg.

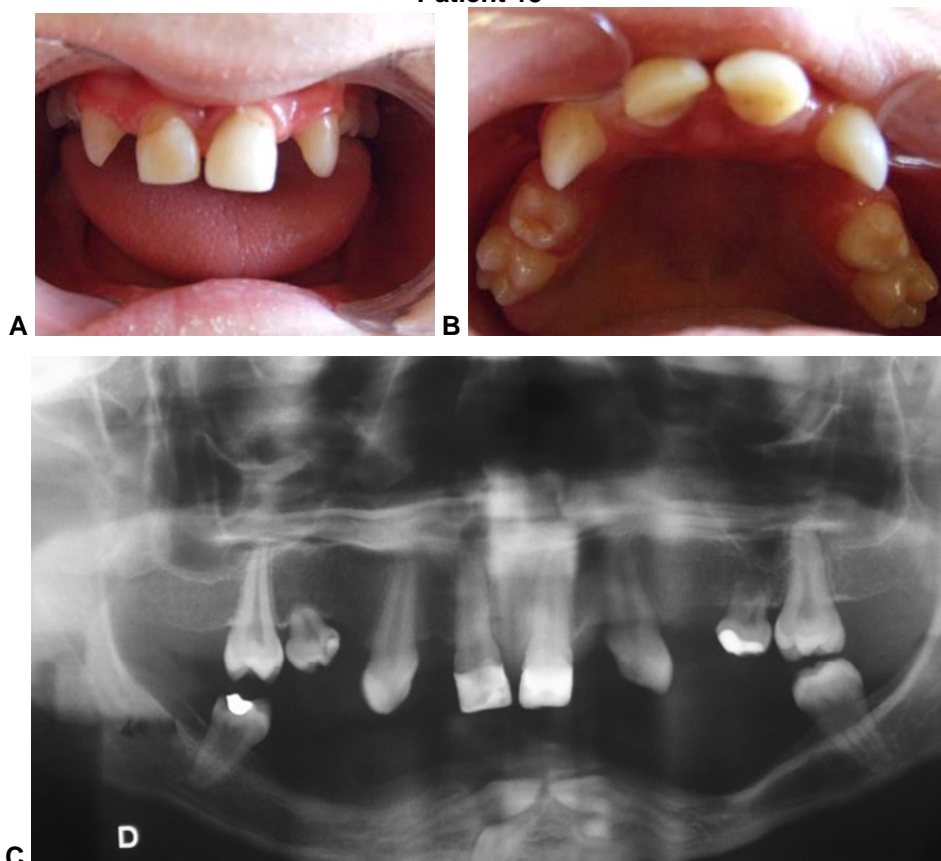
Phénotype		Nombre d'agénésies				
		Incives centrales	Incives latérales	Canines	Prémolaires	Molaires
En denture temporaire	maxillaire	ND	ND	ND		ND
	mandibulaire	2	2	2		4
En denture permanente	maxillaire	ND	ND	ND	ND	ND
	mandibulaire	2	2	2	4	2

**Tableau :** Distribution topographique des agénésies du patient 14.

#### Phénotype dentaire :

- En denture temporaire : Phénotype d'anodontie mandibulaire correspondant au phénotype le plus sévère.
- En denture permanente : Phénotype d'anodontie mandibulaire.

**Patient 15**



**Fig :** Vues cliniques endo-buccales (A et B) et orthopantomogramme (C) du patient 15 présentant une mutation faux-sens c.1048G>T de l'exon 8 du gène *EDA* responsable de la modification protéique p.Gly350Trp.

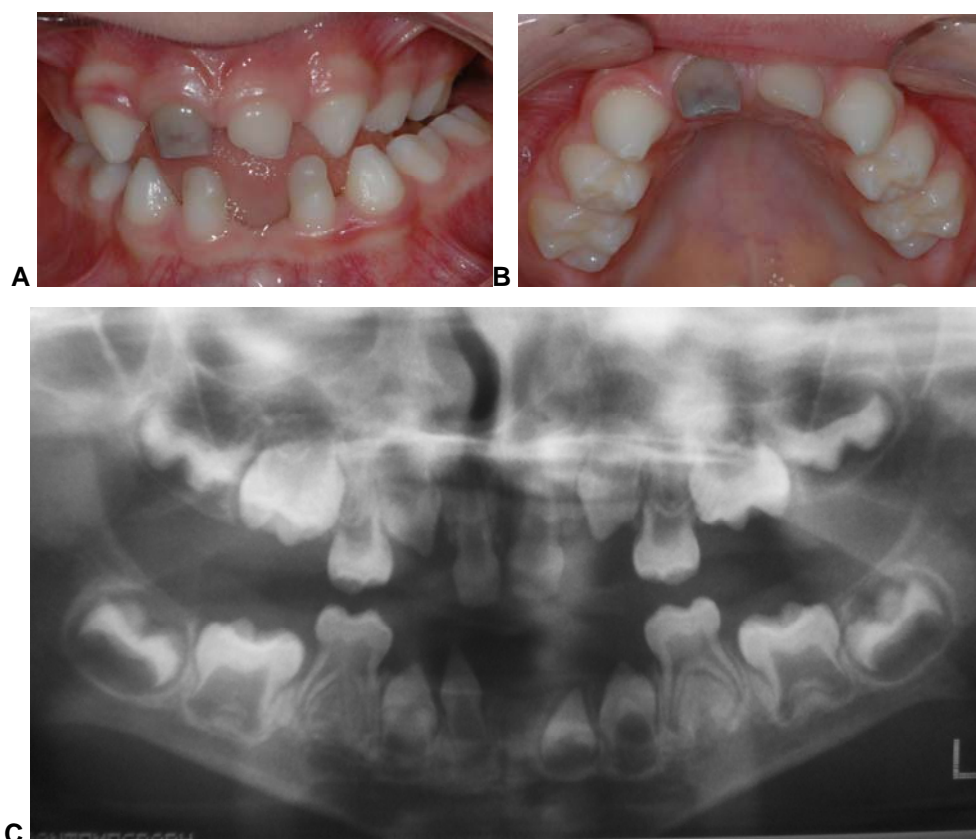
Phénotype		Nombre d'agénésies				
		Incisives centrales	Incisives latérales	Canines	Prémolaires	Molaires
En denture temporaire	maxillaire	ND	ND	ND		2
	mandibulaire	2	2	0		4
En denture permanente	maxillaire	0	2	0	4	2
	mandibulaire	2	2	0	4	2

**Tableau :** Distribution topographique des agénésies chez le patient 15.

**Phénotype dentaire :**

- En denture temporaire : Phénotype d'oligodontie sévère au niveau mandibulaire avec présence uniquement des 2 canines temporaires anastrophiques.
- En denture permanente : Oligodontie sévère plus marquée au niveau mandibulaire (10 agénésies mandibulaires) avec dysmorphies coronaires des incisives et canines maxillaires.

## Patient 16



**Fig :** Vues cliniques endo-buccales (A et B) et orthopantomogramme (C) du patient 16 porteur d'une mutation faux-sens c.1067C>T de l'exon 8 du site TNF.

Phénotype		Nombre d'agénésies				
		Incisives centrales	Incisives latérales	Canines	Prémolaires	Molaires
En denture temporaire	maxillaire	0	2	0		0
	mandibulaire	2	0	0		0
En denture permanente	maxillaire	ND	ND	ND	ND	ND
	mandibulaire	ND	ND	ND	ND	ND

**Tableau :** Distribution topographique des agénésies du patient 16.

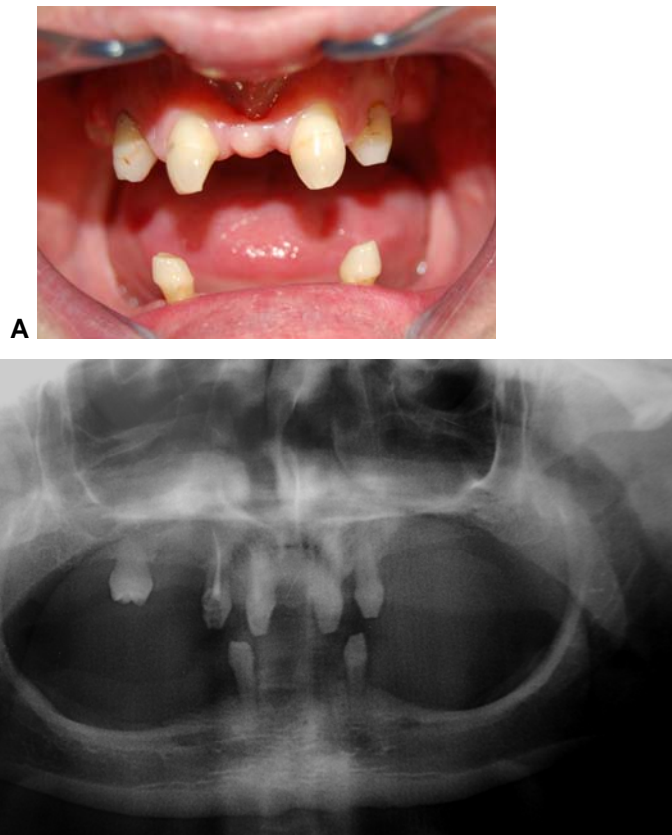
### Phénotype dentaire :

- En denture temporaire : Phénotype d'hypodontie mandibulaire et maxillaire modéré avec agénésies des incisives latérales maxillaires et des incisives centrales mandibulaires. Anomalies morphologiques des incisives latérales mandibulaires.
- En denture permanente : Phénotype non déterminé de par le jeune âge du patient ne permettant une identification des germes présents.



**PHENOTYPES DENTAIRES DES PATIENTS PRESENTANT UNE DELETION INFRAME DU GENE *EDA***

**Patient 17**



**Fig :** Vue clinique endo-buccale (A) et orthopantomogramme (B) du patient 17 porteur d'une délétion exonique de l'exon 2 du gène *EDA*.

Phénotype		Nombre d'agénésies				
		Incisives centrales	Incisives latérales	Canines	Prémolaires	Molaires
En denture temporaire	maxillaire	ND	ND	ND		ND
	mandibulaire	ND	ND	ND		ND
En denture permanente	maxillaire	0	2	0	4	3
	mandibulaire	2	2	0	4	4

**Tableau :** Distribution topographique des agénésies dentaires du patient 17.

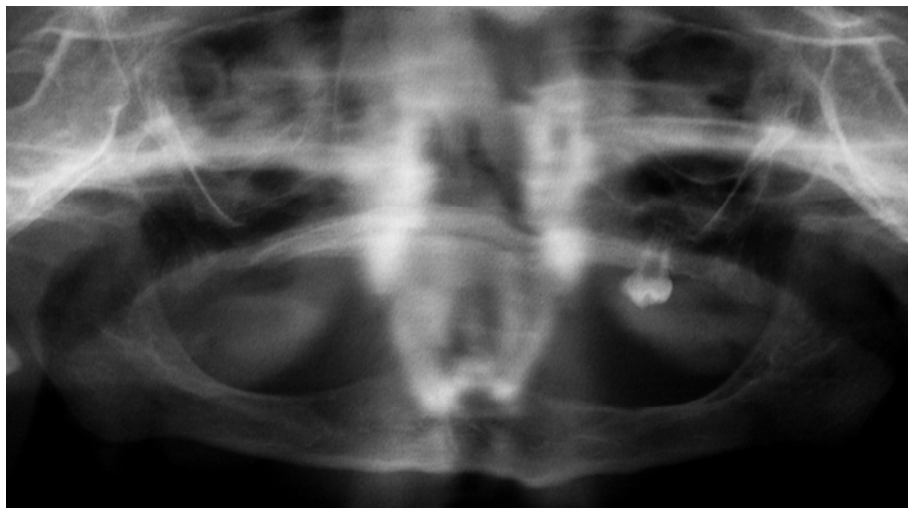
**Phénotype dentaire :**

- En denture permanente : Oligodontie maxillaire avec 9 agénésies et oligodontie sévère mandibulaire avec 12 agénésies.

**Patient 18**



A



B

**Fig :** Vue clinique endo-buccale (A) et orthopantomogramme(B) du patient 18 porteur d'une mutation par délétion in frame de 9bp de l'exon 8 du gène *EDA*.

Phénotype		Nombre d'agénésies				
		Incisives centrales	Incisives latérales	Canines	Prémolaires	Molaires
En denture temporaire	maxillaire	2	2	2		3
	mandibulaire	2	2	2		4
En denture permanente	maxillaire	2	2	2	4	4
	mandibulaire	2	2	2	4	4

**Tableau :** Distribution topographique des agénésies du patient 18.

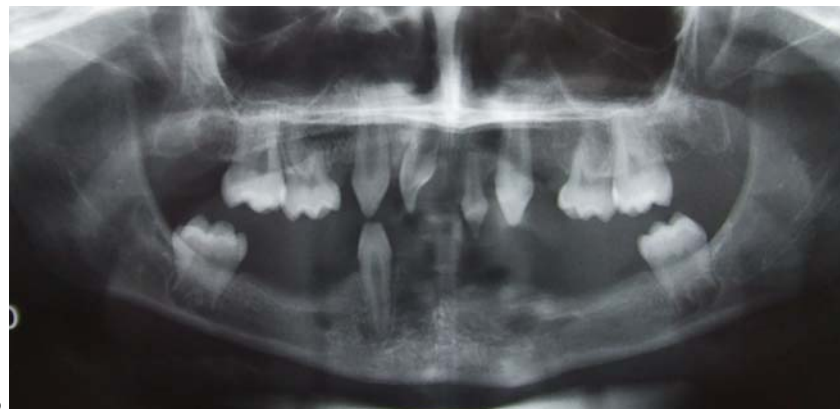
**Phénotype dentaire :**

- En denture temporaire : Phénotype d'anodontie mandibulaire et oligodontie maxillaire sévère avec présence uniquement de la seconde molaire maxillaire gauche.
- En denture permanente : Phénotype d'anodontie.



**PHENOTYPE DENTAIRE D'UN PATIENT PRESENTANT UNE LARGE DELETION GENIQUE DES EXONS 3-8 DU GENE *EDA***

**Patient 20**



**Fig :** Vue clinique endo-buccale (A) et orthopantomogramme (B) du patient 20 présentant une délétion des exons 3-8 du gène *EDA*.

Phénotype		Nombre d'agénésies				
		Incisives centrales	Incisives latérales	Canines	Prémolaires	Molaires
En denture temporaire	maxillaire	1	2	0		2
	mandibulaire	2	2	1		4
En denture permanente	maxillaire	1	2	2	4	2
	mandibulaire	2	2	2	4	2

**Tableau :** distribution topographique des agénésies du patient 20.

**Phénotype dentaire :**

- En denture temporaire : Hypodontie maxillaire et oligodontie sévère mandibulaire avec présence uniquement d'une canine dysmorphique.
- En denture permanente : Oligodontie sévère maxillaire (11 agénésies avec présence de l'incisive centrale permanente droite et des 2 premières molaires permanentes) et oligodontie sévère mandibulaire (12 agénésies). Dysmorphie de l'incisive centrale maxillaire permanente droite.

**PHENOTYPES DENTAIRES DES PATIENTS PRESENTANT UNE MUTATION NON-SENS DU GENE *EDA*.**

**PATIENT 21**



**Fig :** Vue clinique endo-buccale (A) et orthopantomogramme (B) du patient 21 porteur d'une mutation non-sens c.149 C>A de l'exon 1 du gène *EDA* responsable de la modification protéique pSer50X de l'EDA.

Phénotype		Nombre d'agénésies				
		Incisives centrales	Incisives latérales	Canines	Prémolaires	Molaires
En denture temporaire	maxillaire	2	2	0		2
	mandibulaire	2	2	2		4
En denture permanente	maxillaire	0	2	2	4	2
	mandibulaire	2	2	2	4	3

**Tableau :** Distribution topographique des agénésies chez le patient 21.

**Phénotype dentaire :**

- En denture temporaire : Oligodontie sévère au maxillaire et anodontie mandibulaire.
- En denture permanente : Oligodontie sévère au maxillaire et phénotype particulièrement sévère d'oligodontie mandibulaire, avec présence uniquement du germe de la seconde molaire gauche.

**PATIENT 22**



**Fig :** Vue clinique endo-buccale (A) et orthopantomogramme (B) du patient 22 présentant une mutation non-sens c.694 C>T de l'exon 4 gène *EDA*.

Phénotype		Nombre d'agénésies				
		Incisives centrales	Incisives latérales	Canines	Prémolaires	Molaires
En denture temporaire	maxillaire	0	2	0		3
	mandibulaire	2	2	0		4
En denture permanente	maxillaire	0	2	2	4	3
	mandibulaire	2	2	2	4	12

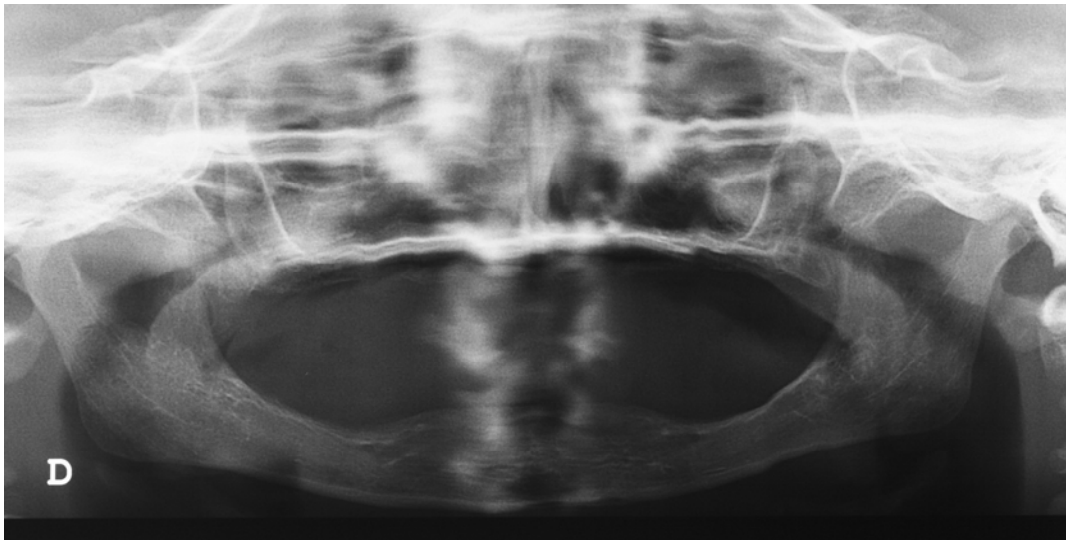
**Tableau :** Distribution topographique des agénésies chez le patient 22.

**Phénotype dentaire :**

- En denture temporaire : Hypodontie maxillaire (agénésies des incisives latérales et de 3 molaires) et oligodontie mandibulaire sévère (8 agénésies avec présence uniquement des canines temporaires). Anomalies morphologiques coronaires des incisives centrales maxillaires et des canines mandibulaires.
- En denture permanente : Phénotype d'oligodontie maxillaire (11 agénésies) et oligodontie mandibulaire (12 agénésies des incisives, canines, prémolaires et de 2 molaires).

**PHENOTYPES DENTAIRES DES PATIENTS PRESENTANT UNE MUTATION FRAMESHIFT DU GENE EDA**

**Patient 23**



**Fig :** Orthopantomogramme du patient 23 porteur d'une mutation frameshift c.579Del T de l'exon 4 du gène *EDA*.

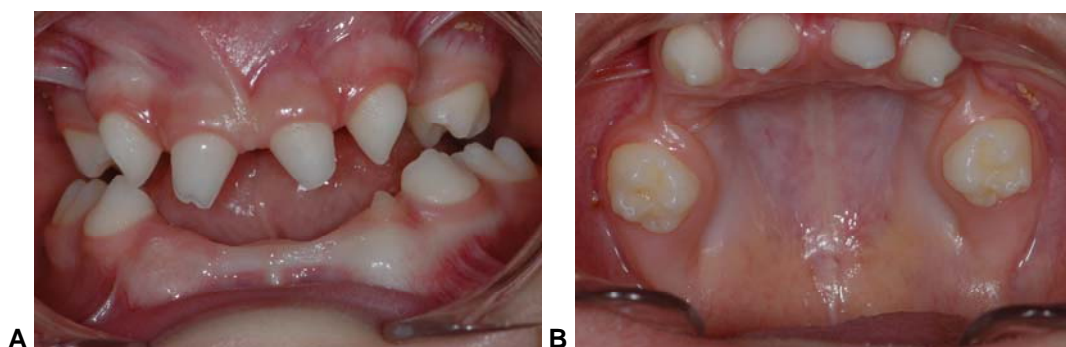
Phénotype		Nombre d'agénésies				
		Incisives centrales	Incisives latérales	Canines	Prémolaires	Molaires
En denture temporaire	maxillaire	2	2	2		4
	mandibulaire	2	2	2		4
En denture permanente	maxillaire	2	2	2	4	4
	mandibulaire	2	2	2	4	4

**Tableau :** Distribution topographique des agénésies chez le patient 23.

**Phénotype dentaire :**

- En denture temporaire : Phénotype sévère d'anodontie.
- En denture permanente : Anodontie mandibulaire et maxillaire.

### Patient 24



**Fig :** Vues cliniques endo-buccales (A et B) d'un patient DEX âgé de 3 ans ½ présentant une mutation frameshift de l'exon 4 du gène *EDA*. (c.572-590 Del responsable de la modification protéique p.Pro191Argfs82X)

Phénotype		Nombre d'agénésies				
		Incisives centrales	Incisives latérales	Canines	Prémolaires	Molaires
En denture temporaire	maxillaire	0	2	0		2
	mandibulaire	2	2	0		0
En denture permanente	maxillaire	ND	ND	ND	ND	ND
	mandibulaire	ND	ND	ND	ND	ND

**Tableau :** Distribution topographique des agénésies du patient 24.

#### Phénotype dentaire :

- En denture temporaire : Hypodontie modérée au niveau maxillaire (4 agénésies) et mandibulaire (4 agénésies).

## PHENOTYPES DENTAIRES ASSOCIES AUX FORMES AUTOSOMIQUES DOMINANTES ET RECESSIVES DE DYSPLASIE ECTODERMIQUE HYPOHIDROTIQUE

Les formes autosomiques dominantes et récessives de DEH, sont associées à des mutations du complexe moléculaire Ectodysplasin Receptor (EDAR)-Ectodysplasin Receptor EDARADD. Une analyse phénotypique dentaire des formes autosomiques de DEH est réalisée et vise la compréhension des relations entre phénotype et altération moléculaire de l'interaction EDA-EDAR ou EDARADD-TRAF6.

Patient 27



**Fig:** Orthopantomogramme du patient 27 atteint d'une forme autosomique récessive de DEH hétérozygote pour la mutation faux-sens c.266 G>A (exon 3) la mutation splice c.528+1 G>A (exon 6) du gène *EDAR* responsables de la modification protéique p. Cys47Tyr.

Phénotype		Nombre d'agénésies				
		Incisives centrales	Incisives latérales	Canines	Prémolaires	Molaires
En denture temporaire	maxillaire	1	2	1		2
	mandibulaire	2	2	2		4
En denture permanente	maxillaire	1	2	2	4	2
	mandibulaire	2	2	2	4	4

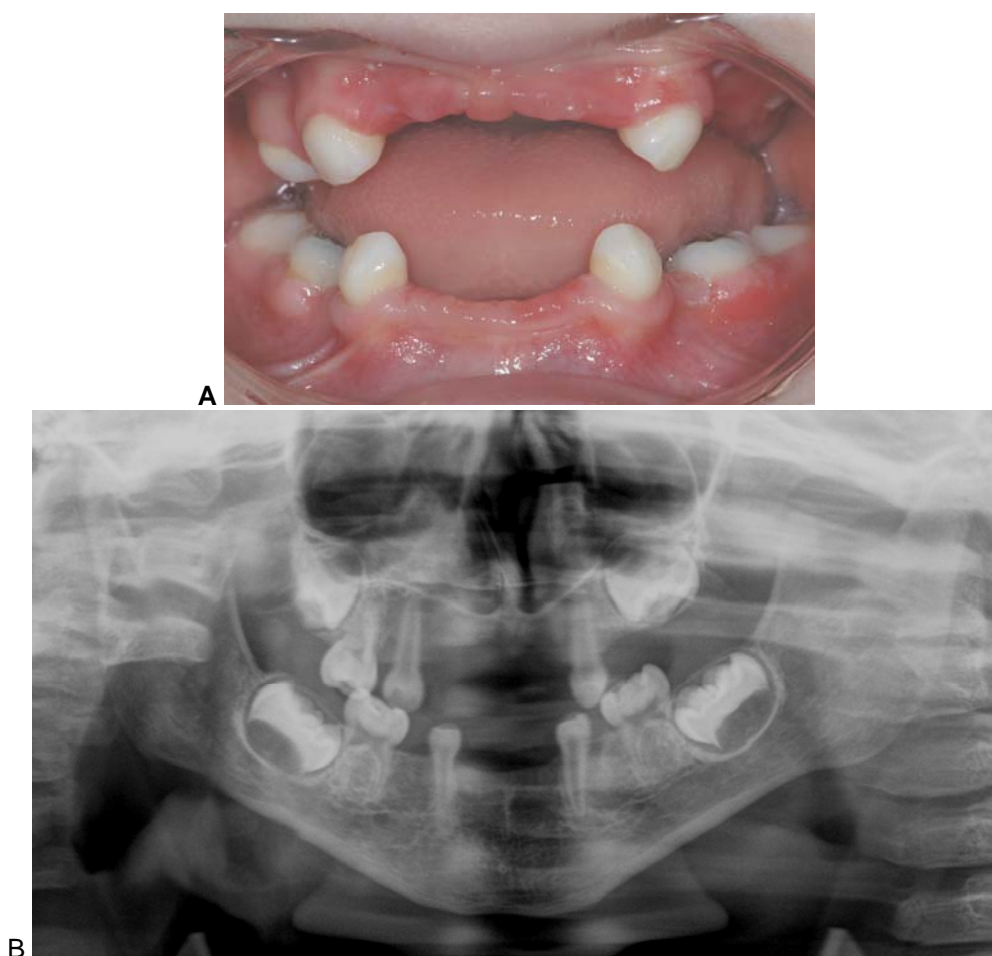
**Tableau :** Distribution topographique des agénésies chez le patient 27.

### Phénotype dentaire :

- En denture temporaire : Oligodontie au niveau maxillaire et anodontie mandibulaire.
- En denture permanente : Oligodontie sévère au niveau maxillaire et phénotype particulièrement sévère d'anodontie mandibulaire.



### Patient 28



**Fig :** Vue clinique endo-buccale (A) et orthopantomogramme (B) du patient 28 présentant une mutation du gène *EDAR*.

Phénotype		Nombre d'agénésies				
		Incisives centrales	Incisives latérales	Canines	Prémolaires	Molaires
En denture temporaire	maxillaire	2	2	0		3
	mandibulaire	2	2	0		2
En denture permanente	maxillaire	2	2	2	4	2
	mandibulaire	2	2	2	4	2

**Tableau :** Distribution topographique des agénésies chez le patient 28.

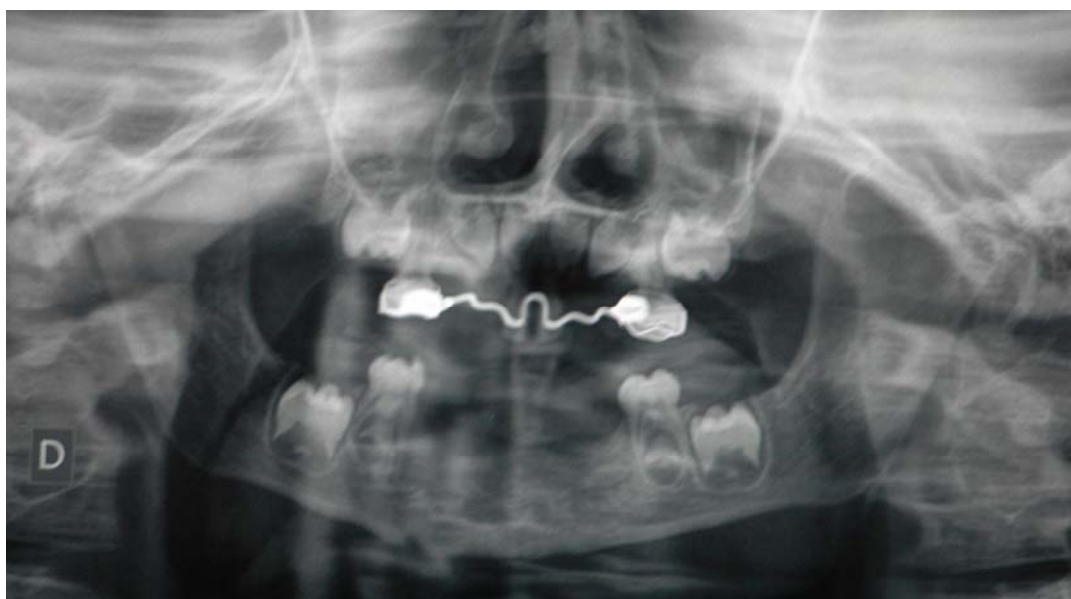
#### Phénotype dentaire :

- En denture temporaire : Oligodontie maxillaire (7 agénésies des incisives et de 3 molaires) et mandibulaire (6 agénésies des incisives et des premières molaires).
- En denture permanente : Phénotype d'oligodontie très sévère au niveau maxillaire (12 agénésies avec présence uniquement des premières molaires) et mandibulaire (12 agénésies). Phénotype associé à une forme autosomique récessive de DEH (plus sévère que les formes autosomiques dominantes).

## Patient 29



A



B

**Fig :** Vue clinique endo-buccale (A) et orthopantomogramme (B) du patient 29 présentant une forme autosomique récessive de DEH avec les mutations à l'état hétérozygote 266 G>A (exon 4 du gène *EDAR*) et c.528+1 G>A (exon 6).

Phénotype		Nombre d'agénésies				
		Incisives centrales	Incisives latérales	Canines	Prémolaires	Molaires
En denture temporaire	maxillaire	2	2	2		2
	mandibulaire	2	2	2		2
En denture permanente	maxillaire	0	2	0	4	2
	mandibulaire	2	2	2	2	2

**Tableau :** Distribution topographique des agénésies chez le patient 29.

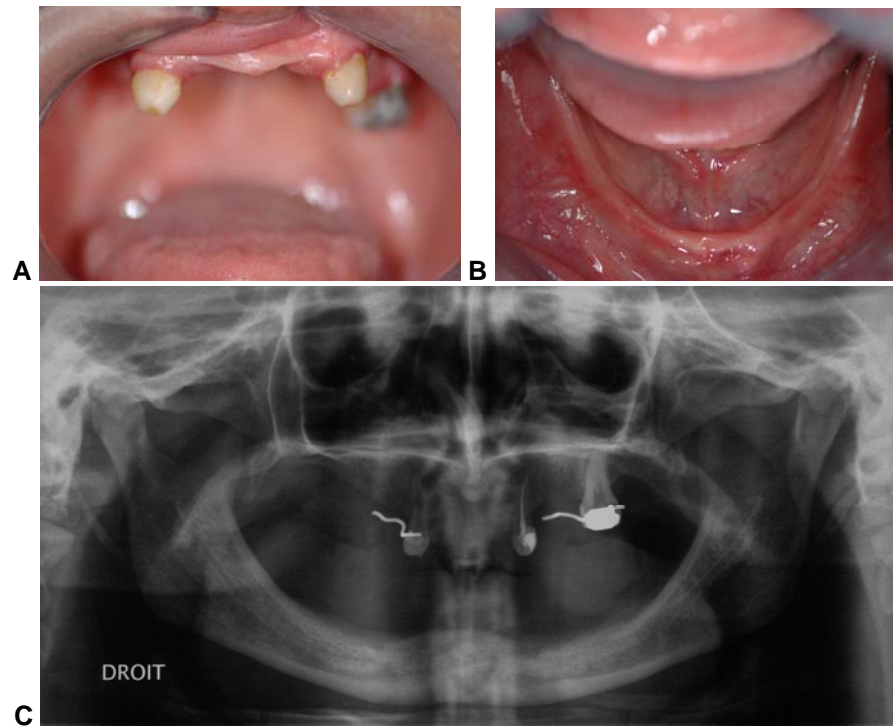
### Phénotype dentaire :

- En denture temporaire : Oligodontie maxillaire (8 agénésies des incisives, des canines et des premières molaires) et mandibulaire (8 agénésies des incisives et des premières molaires).
- En denture permanente : Phénotype d'oligodontie sévère au niveau maxillaire (8 agénésies) et mandibulaire (10 agénésies). Phénotype associé à une forme autosomique dominante de DEH (plus sévère que les formes autosomiques dominantes).



**PHENOTYPE DENTAIRE DE PATIENTS DEH DONT LE DIAGNOSTIC MOLECULAIRE EST EN COURS D'ANALYSE**

**Patient 37**



**Fig :** Vues cliniques endo-buccales (A et B) et orthopantomogramme (C) du patient 37.

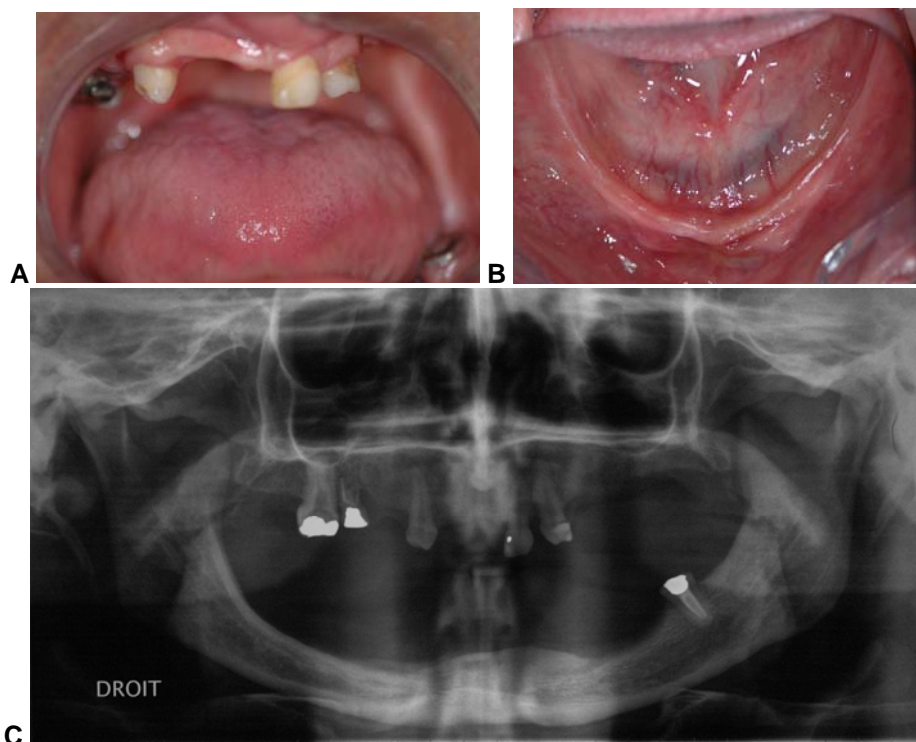
Phénotype		Nombre d'agénésies				
		Incisives centrales	Incisives latérales	Canines	Prémolaires	Molaires
En denture temporaire	maxillaire	ND	ND	ND		ND
	mandibulaire	ND	ND	ND		ND
En denture permanente	maxillaire	2	2	0	4	3
	mandibulaire	2	2	2	4	4

**Tableau :** Distribution topographique des agénésies chez le patient 37.

**Phénotype dentaire :**

- En denture permanente : Oligodontie sévère au maxillaire (11 agénésies) et phénotype particulièrement sévère d'anodontie mandibulaire.

### Patient 38



**Fig :** Vues cliniques endo-buccales (A et B) et orthopantomogramme (C) du patient 38 (Jumeau monozygote du patient 37).

Phénotype		Nombre d'agénésies				
		Incisives centrales	Incisives latérales	Canines	Prémolaires	Molaires
En denture temporaire	maxillaire	ND	ND	ND		ND
	mandibulaire	ND	ND	ND		ND
En denture permanente	maxillaire	1	2	0	4	3
	mandibulaire	2	2	2	4	3

**Tableau :** Distribution topographique des agénésies chez le patient 38.

#### Phénotype dentaire :

- En denture permanente : Oligodontie sévère au maxillaire (10 agénésies) et phénotype sévère d'oligodontie mandibulaire (présence uniquement d'une molaire)

**Patient 39**



**Fig :** Vue clinique endo-buccale (A) et orthopantomogramme (B) du patient 39 (suspicion de mutation du gène *NEMO*).

Phénotype		Nombre d'agénésies				
		Incisives centrales	Incisives latérales	Canines	Prémolaires	Molaires
En denture temporaire	maxillaire	ND	ND	ND		ND
	mandibulaire	0	0	0		2
En denture permanente	maxillaire	0	2	0	2	2
	mandibulaire	2	2	2	2	2

**Tableau :** Distribution topographique des agénésies chez le patient 39.

**Phénotype dentaire :**

- En denture temporaire : Phénotype modéré d'hypodontie mandibulaire avec les agénésies des secondes molaires
- En denture permanente : Oligodontie modérée au maxillaire (6 agénésies) et phénotype sévère d'oligodontie mandibulaire (présence uniquement des premières prémolaires et de 2 molaires). Hypoplasies de l'émail associées au phénotype dentaire.

**Patient 41**



**Fig :** Orthopantomogramme du patient 41.

Phénotype		Nombre d'agénésies				
		Incisives centrales	Incisives latérales	Canines	Prémolaires	Molaires
En denture temporaire	maxillaire	ND	ND	ND		ND
	mandibulaire	ND	ND	ND		ND
En denture permanente	maxillaire	0	0	2	4	2
	mandibulaire	2	2	2	4	3

**Tableau :** Distribution topographique des agénésies chez le patient 41.

**Phénotype dentaire :**

- En denture permanente : Oligodontie mandibulaire sévère (13 agénésies avec présence uniquement d'une molaire) et maxillaire (8 agénésies des canines, prémolaires et des secondes molaires)

Patient 43



A



B

Fig : Vue clinique endo-buccales (A) et orthopantomogramme (B) du patient 43.

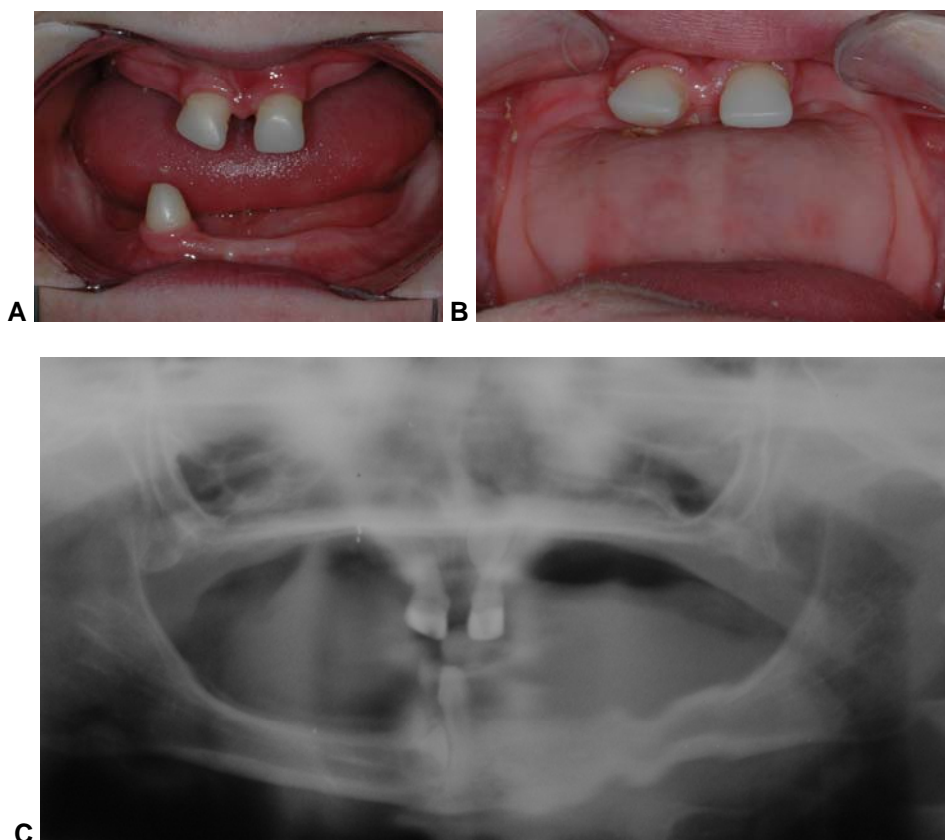
Phénotype		Nombre d'agénésies				
		Incisives centrales	Incisives latérales	Canines	Prémolaires	Molaires
En denture temporaire	maxillaire	ND	ND	ND		ND
	mandibulaire	ND	ND	ND		ND
En denture permanente	maxillaire	0	0	2	4	2
	mandibulaire	0	0	2	4	2

Tableau : Distribution topographique des agénésies chez le patient 43.

**Phénotype dentaire :**

- En denture permanente : Oligodontie au niveau maxillaire (8 agénésies) et mandibulaire (8 agénésies).

**Patient 45**



**Fig :** Vues cliniques endo-buccales (A et B) et orthopantomogramme (C) du patient 45.

Phénotype		Nombre d'agénésies				
		Incisives centrales	Incisives latérales	Canines	Prémolaires	Molaires
En denture temporaire	maxillaire	0	2	2		4
	mandibulaire	1	2	2		4
En denture permanente	maxillaire	1	2	2	4	4
	mandibulaire	2	2	1	4	4

**Tableau :** Distribution topographique des agénésies chez le patient 45.

**Résultat du phénotype dentaire:**

- En denture temporaire : Phénotype d'oligodontie sévère maxillaire (8 agénésie avec présence uniquement des incisives centrales) et mandibulaire (9 agénésies avec présence d'une canine).
- En denture permanente : Phénotype d'oligodontie sévère maxillaire (13 agénésies) et mandibulaire (13 agénésies).

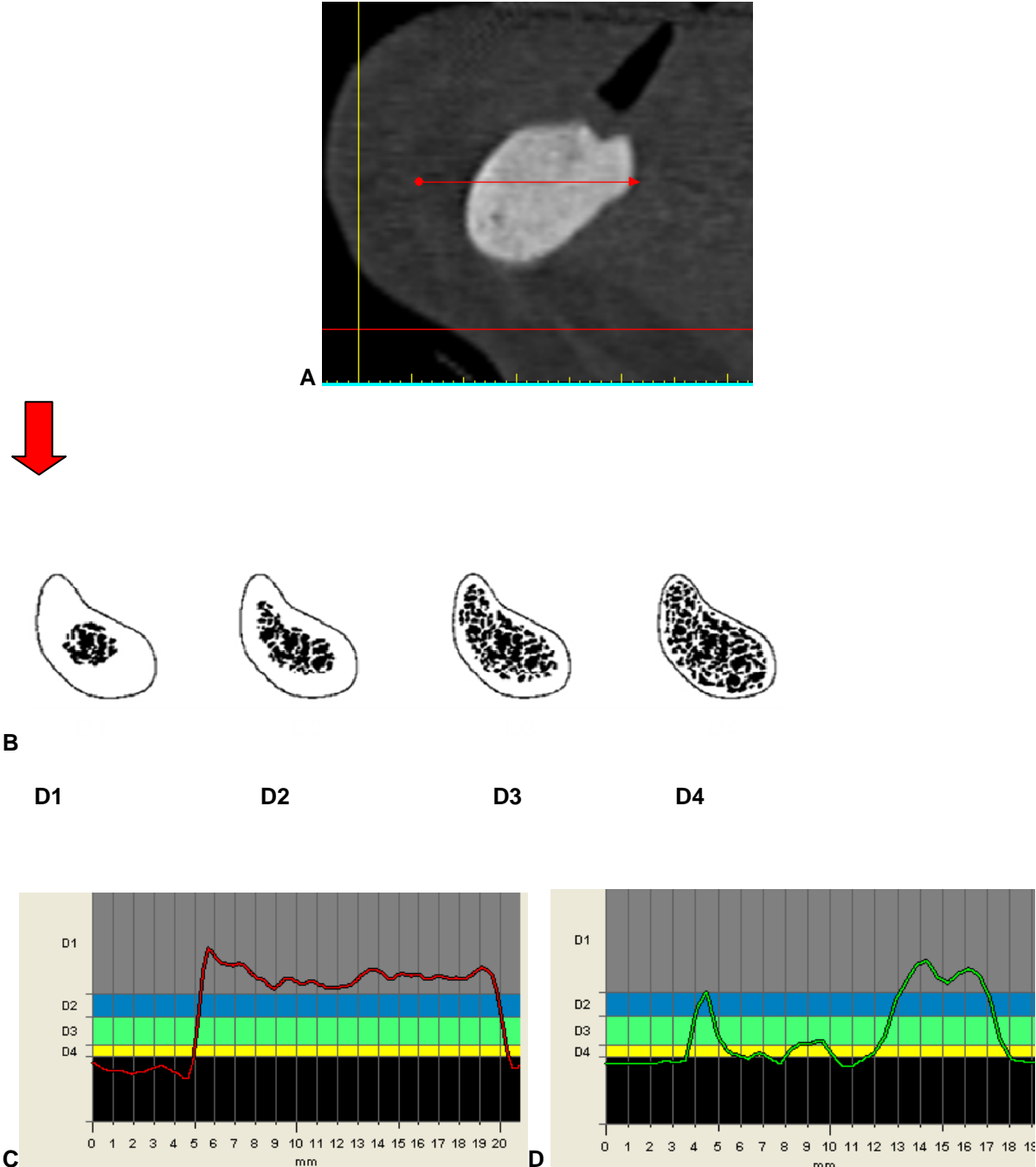
## **ANNEXE 3**

### **Phénotype osseux**

---

**ANALYSE DES DENSITES OSSEUSES SELON LA CLASSIFICATION DE LEKHOLM ET ZARB ET EN UNITES HOUNSFIELDS (HU) CHEZ LES PATIENTS DEX DONT LA MUTATION EST IDENTIFIEE**

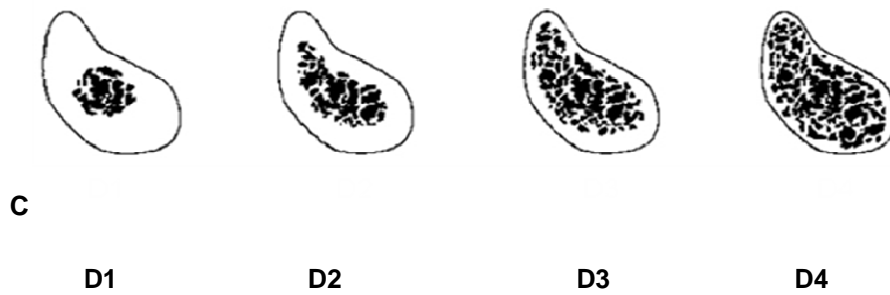
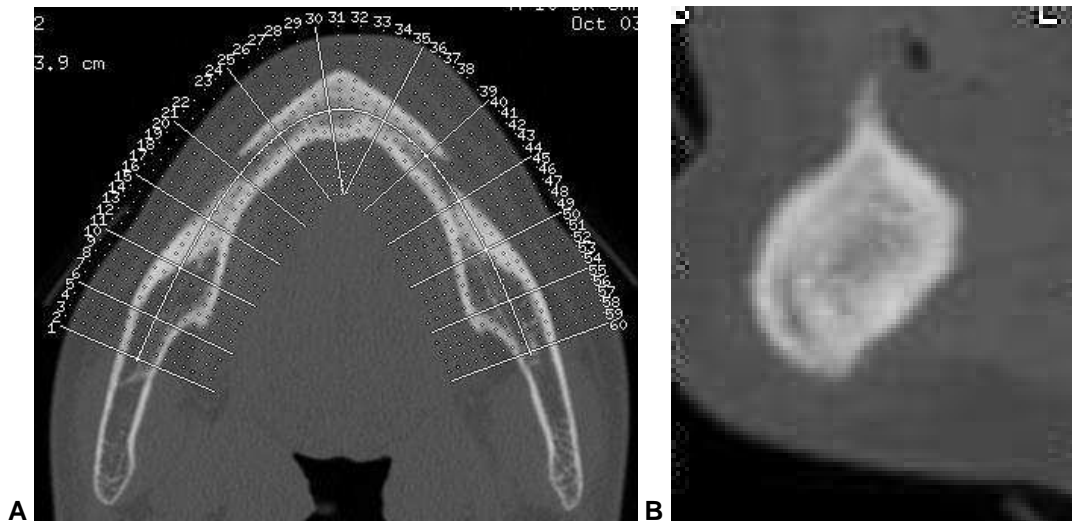
**Patient 9**



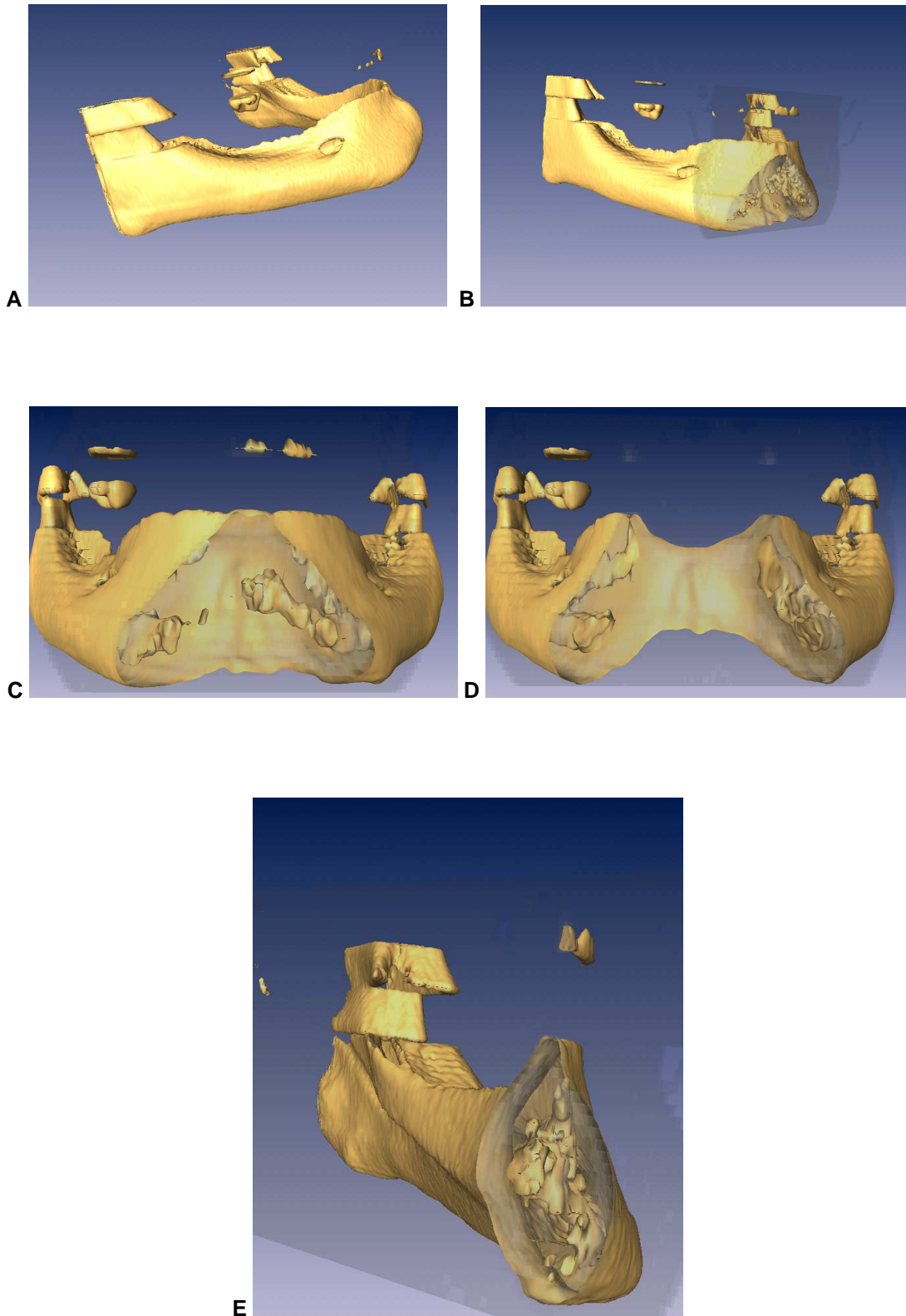
**Fig:** Coupe scannographique sagittale mandibulaire(A), avec densité osseuse selon la classification de Lekholm et Zarb (B) du patient 9 présentant une mutation faux-sens c.754 C>A de l'exon 6 du gène *EDA*. Courbes densitométriques de la région symphysaire du patient 9 (C) et contrôle (D).



Patient 14

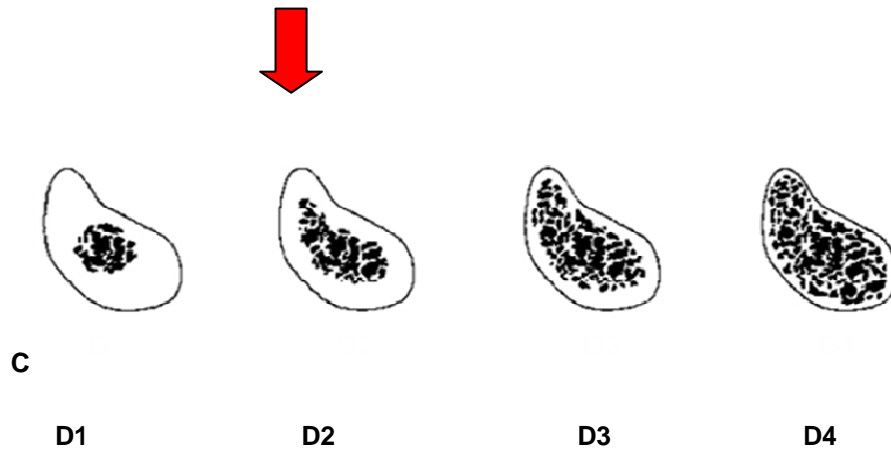
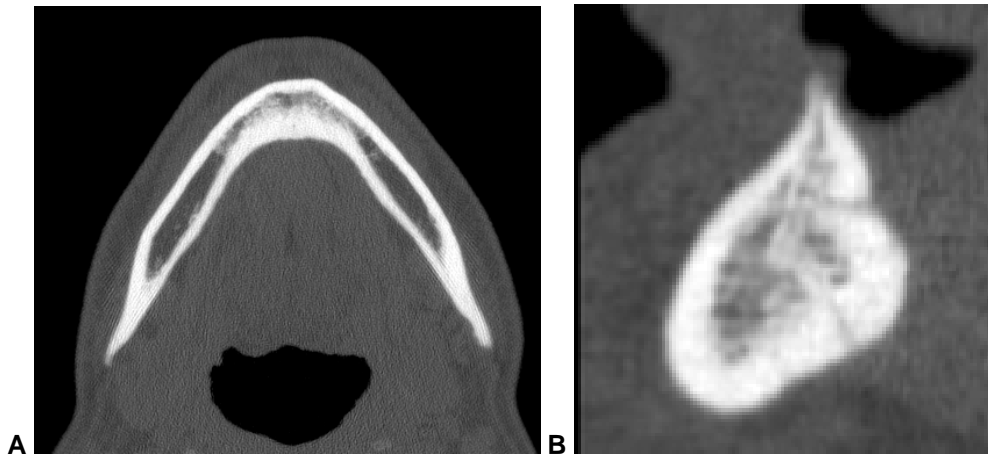


**Fig :** Coupes scannographiques transversale (A) et sagittale (B) mandibulaire, avec densité osseuse selon la classification de Lekholm et Zarb (C) du patient 14 présentant une mutation faux-sens c.820 T>C de l'exon 7 du gène *EDA*.



**Fig :** Reconstructions tridimensionnelles en isosurface de la mandibule du patient 14 (A-B) avec coupes frontales (C-D) et sagittale (E).

Patient 17



**Fig:** Coupes scannographiques transversale (A) et sagittale (B) mandibulaire, avec densité osseuse selon la classification de Lekholm et Zarb du patient 17 présentant une mutation par délétion Del c.503-526 de l'exon 2 du gène *EDA*.

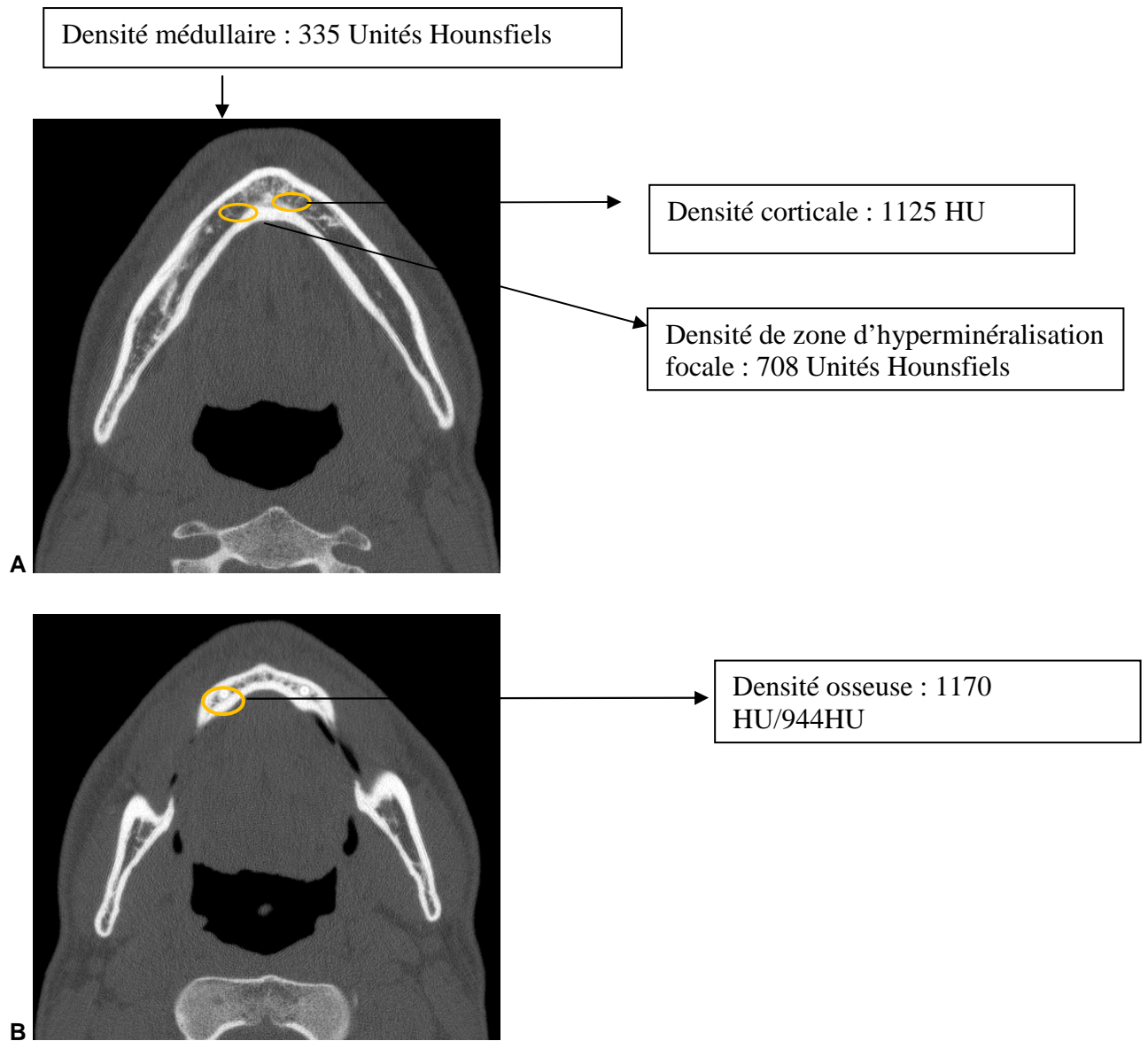


Densité osseuse corticale basale :  
1037 HU/835-1113 HU

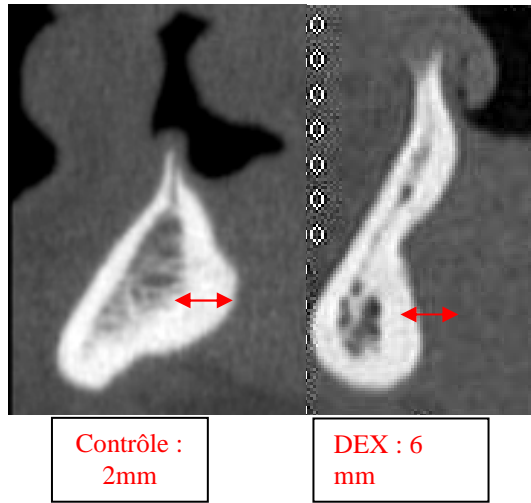


Densité osseuse corticale  
alvéolaire : 1011 HU/810-940  
HU

**Fig:** Analyses des densités osseuses corticales basales (A) et alvéolaires (B) maxillaires en Unités Hounsfields du patient 17.

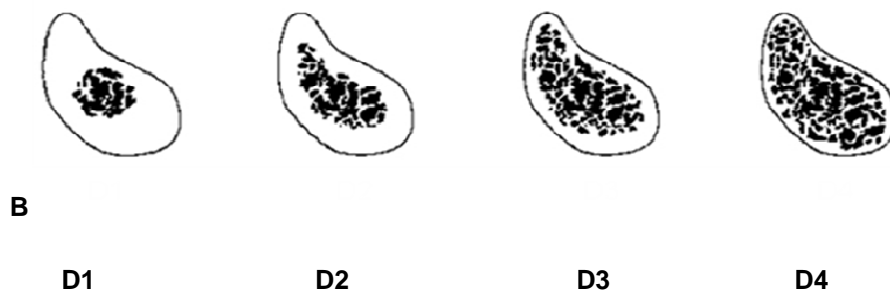
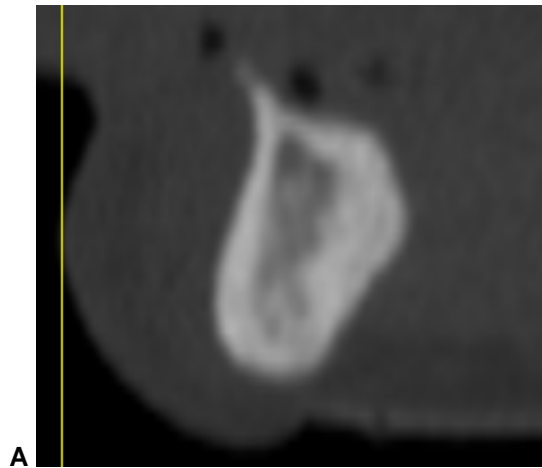


**Fig:** Analyses des densités osseuses mandibulaires en Unités Hounsfiels du patient 17.

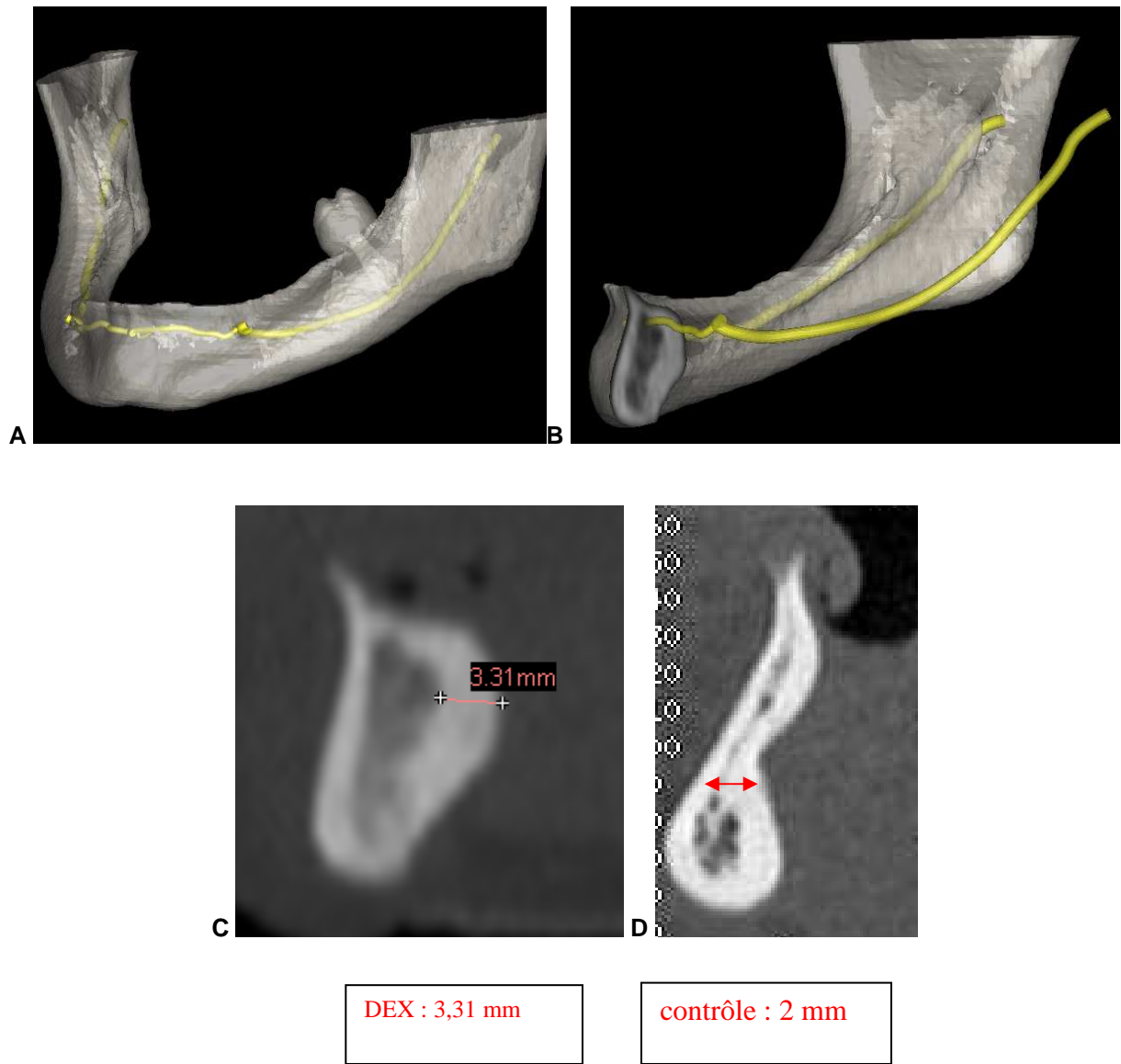


**Fig:** Analyse de l'épaisseur corticale linguale du patient 17.

Patient 21



**Fig:** Coupe scannographique de la région symphysaire mandibulaire (A) et densité osseuse selon la classification de Lekholm et Zarb du patient 21 présentant une mutation non-sens c.149 C>A de l'exon 1 du gène *EDA*.

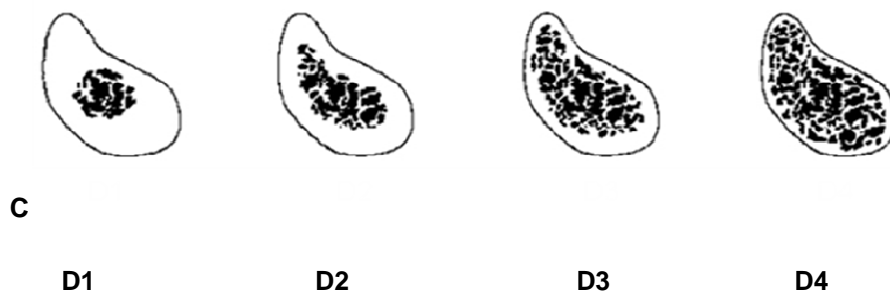
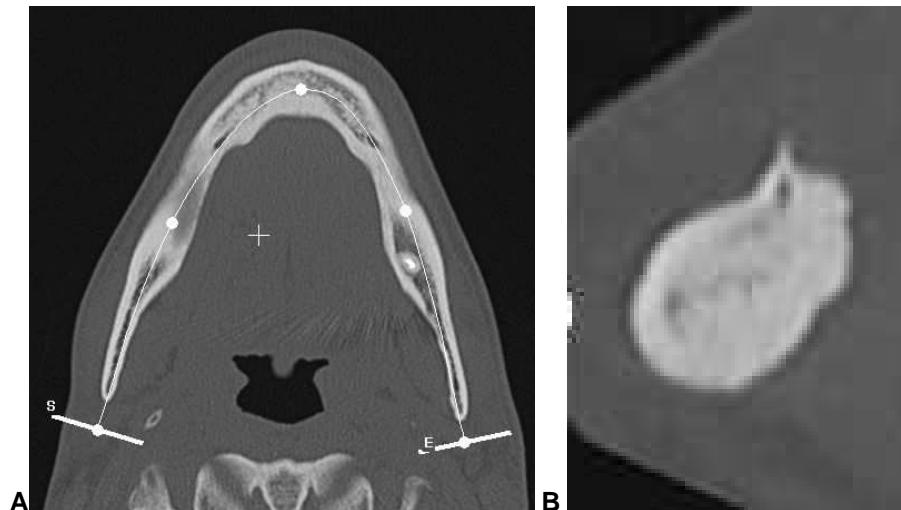


**Fig :** Reconstructions tridimensionnelles mandibulaires (A-B) et analyse de l'épaisseur corticale linguale chez le patient 21 (C) et un patient contrôle (D).

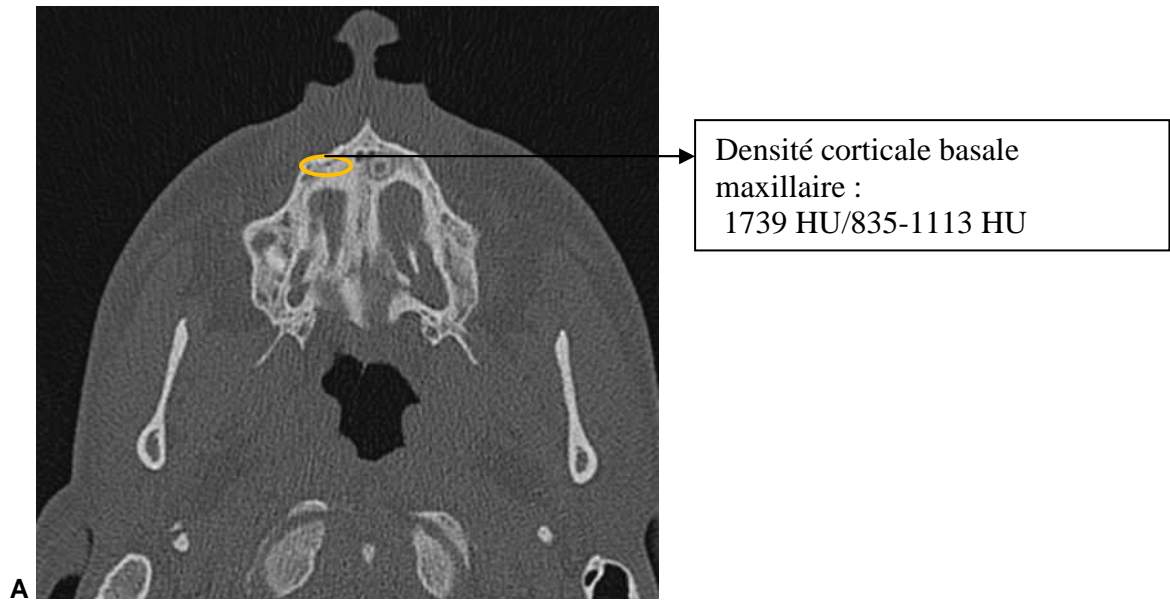


**ANALYSE DES DENSITES OSSEUSES SELON LA CLASSIFICATION DE LEKHOLM ET ZARB ET EN UNITES HOUNSFIELDS (HU) CHEZ LES PATIENTS DEH DONT LA MUTATION EST EN COURS D'ANALYSE**

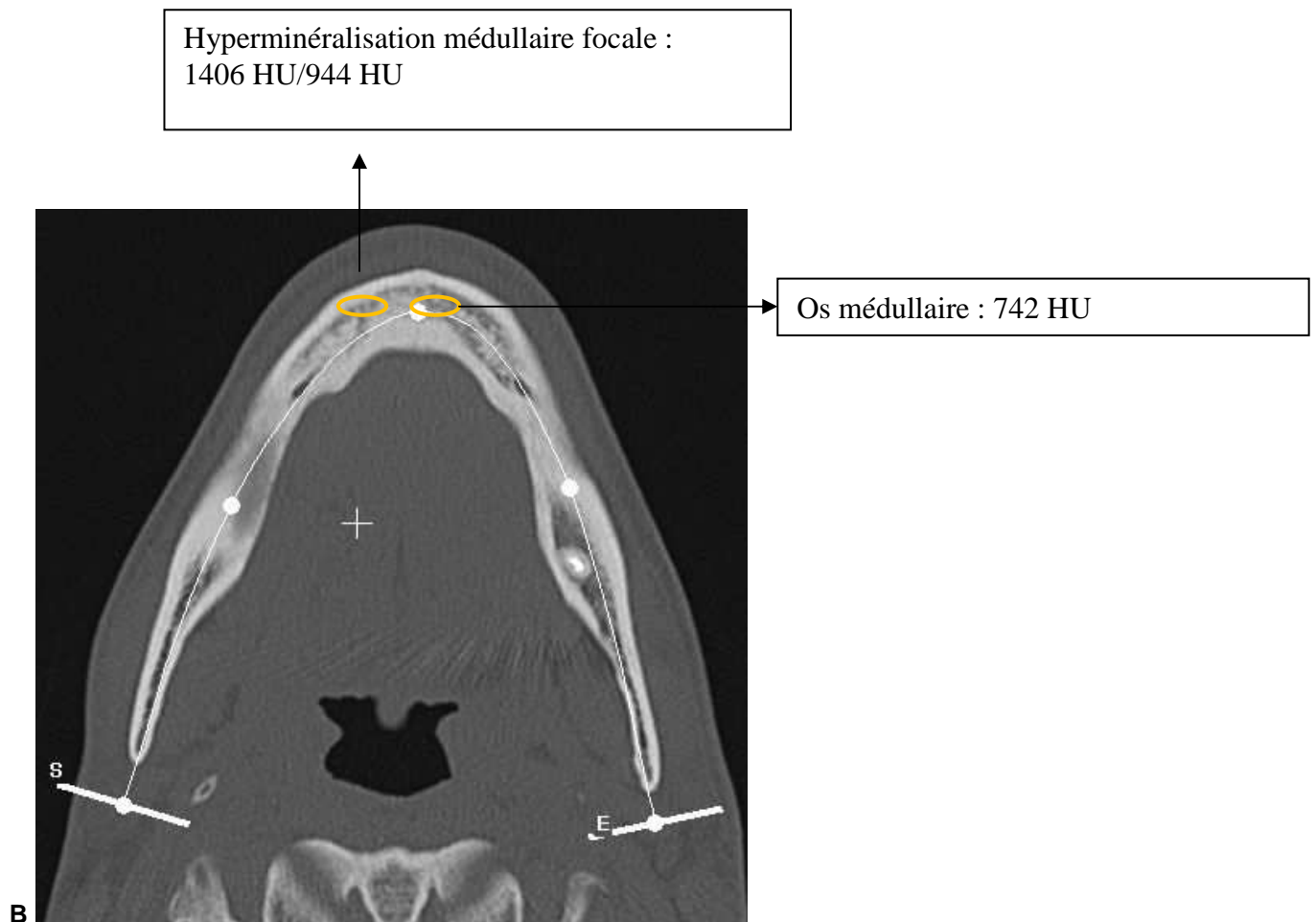
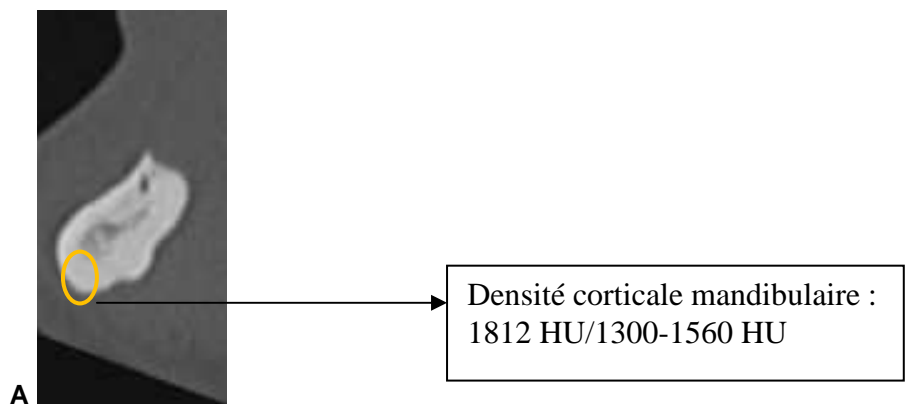
**Patient 37**



**Fig:** Coupes scannographiques transversale (A) et sagittale (B) mandibulaires, avec densité osseuse selon la classification de Lekholm et Zarb (C) du patient 37.

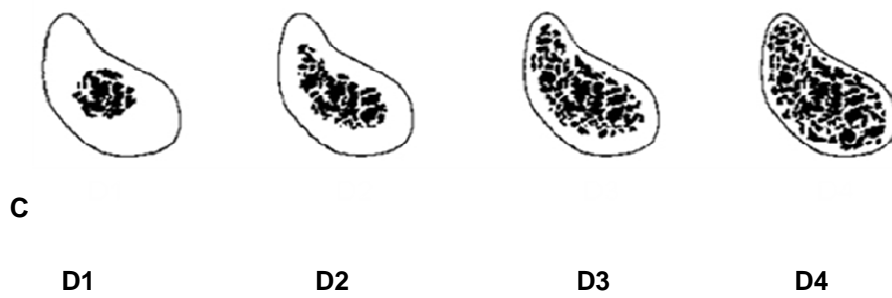
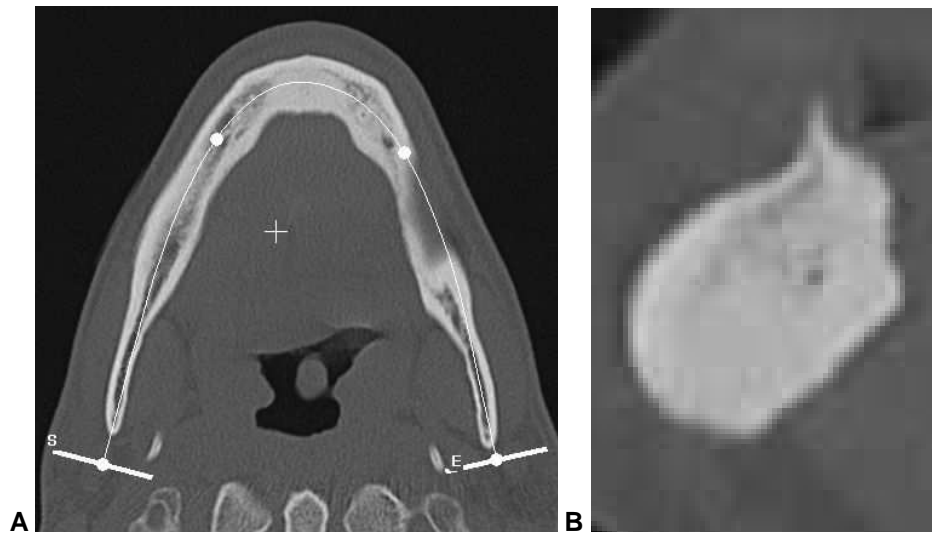


**Fig:** Analyses de la densité osseuse corticale basale (A) et alvéolaire (B) maxillaire en unités Hounsfields du patient 37.

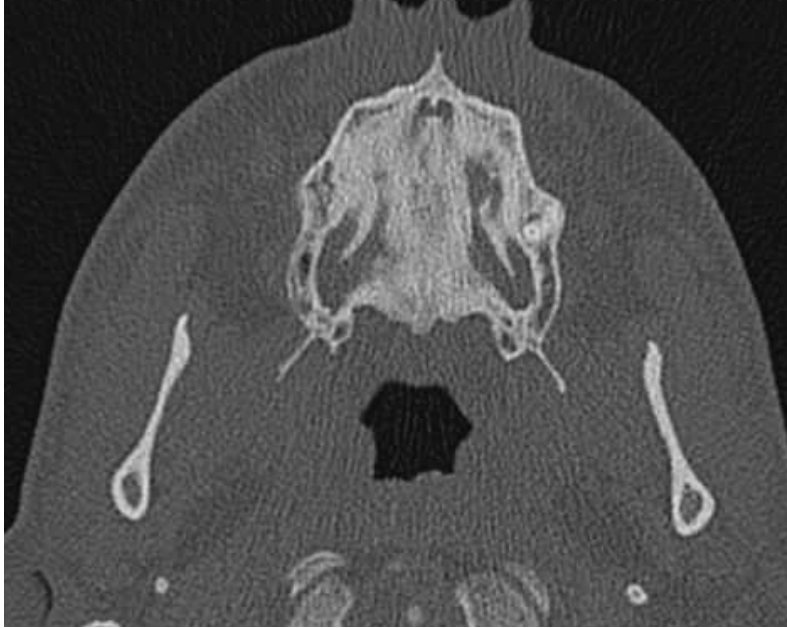


**Fig:** Analyses de la densité osseuse corticale (A) et médullaire (B) mandibulaires du patient 37.

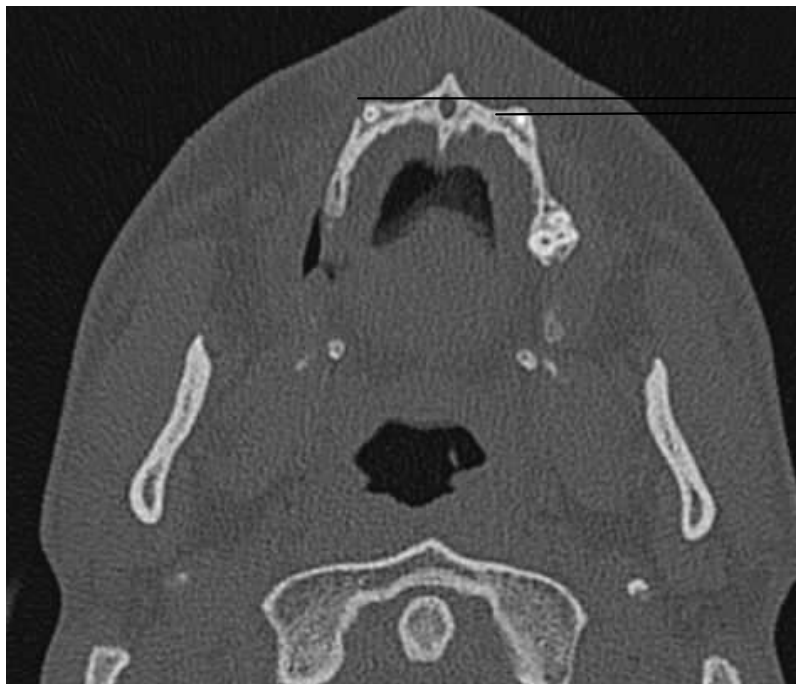
Patient 38



**Fig:** Coupes scannographiques transversale (A) et sagittale (B) mandibulaires, avec densité osseuse selon la classification de Lekholm et Zarb (C) du patient 38.

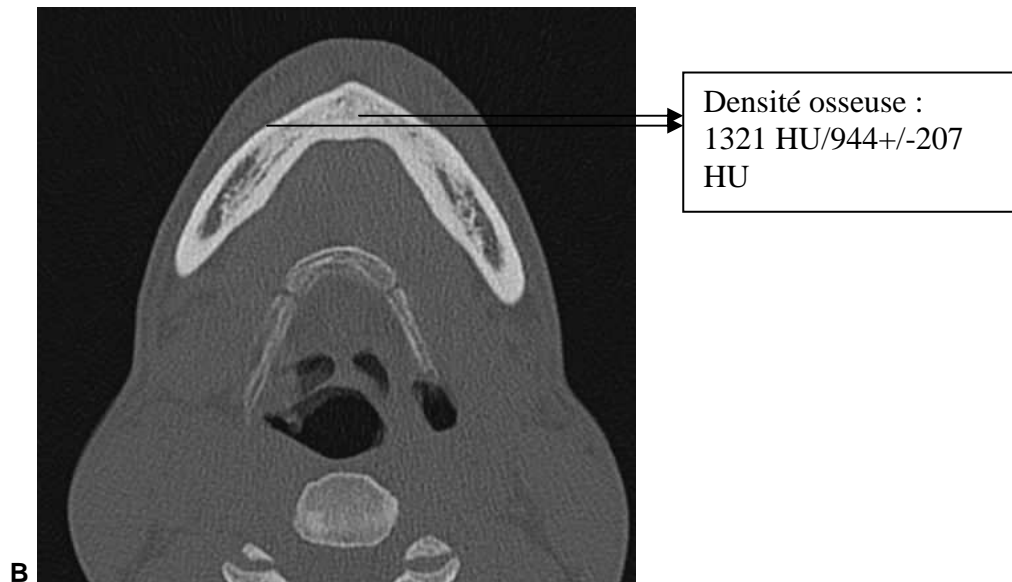
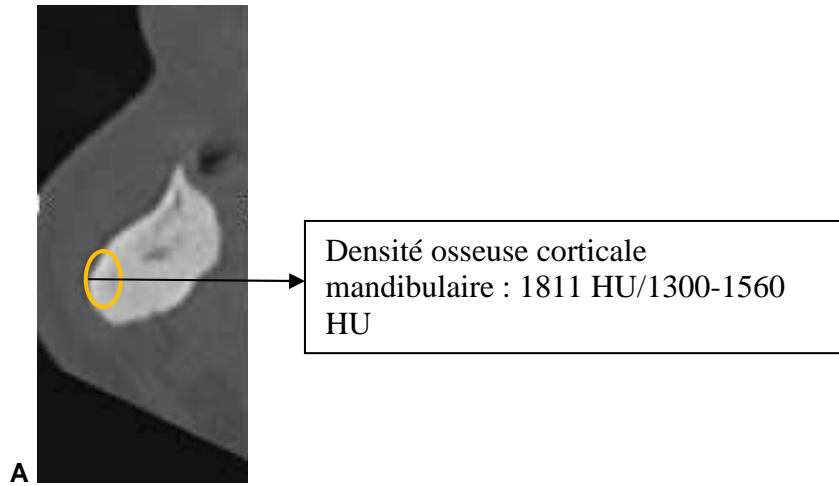


Densité osseuse corticale :  
1617 HU/835-1113 HU



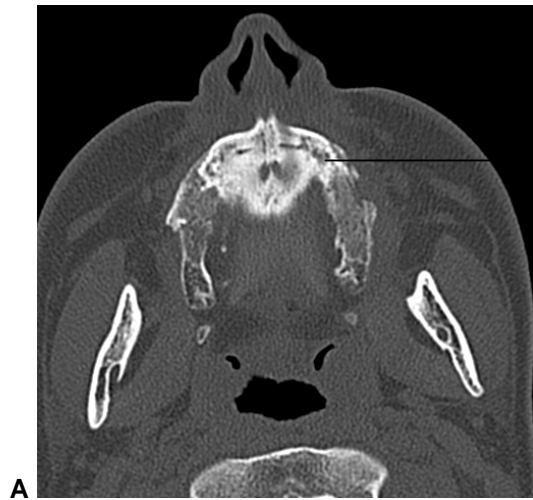
Densité corticale de l'os  
alvéolaire : 1459 HU/810-940 HU

**Fig:** Analyses de la densité osseuse corticale basale (A) et alvéolaire (B) maxillaires en unités Hounsfields du patient 38.



**Fig** : Analyses de la densité osseuse de la région symphysaire mandibulaire en unités Hounsfields du patient 38.

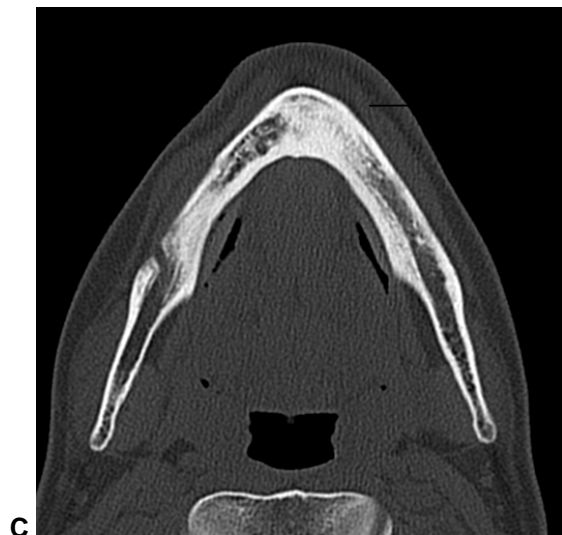
Patient 40



Densité osseuse corticale basale  
maxillaire : 1011 HU/ 835-1113  
HU



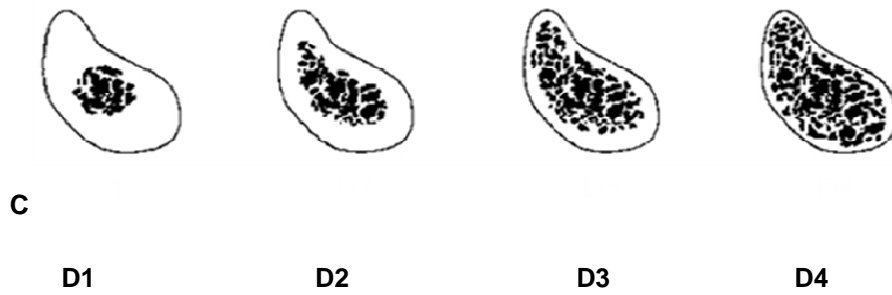
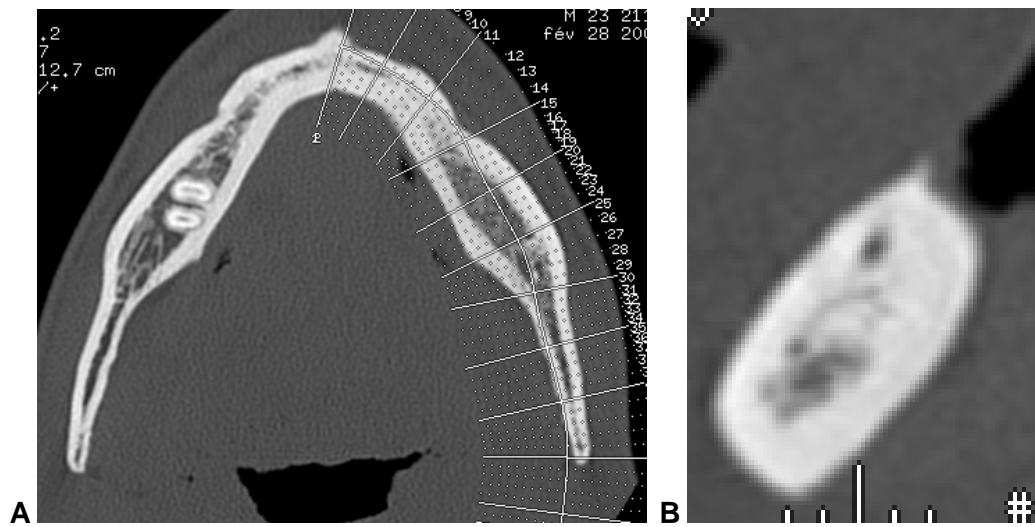
Densité osseuse corticale  
alvéolaire :  
991 HU/810-940 HU



Densité osseuse corticale  
mandibulaire : 1390 HU/1300-1560  
HU

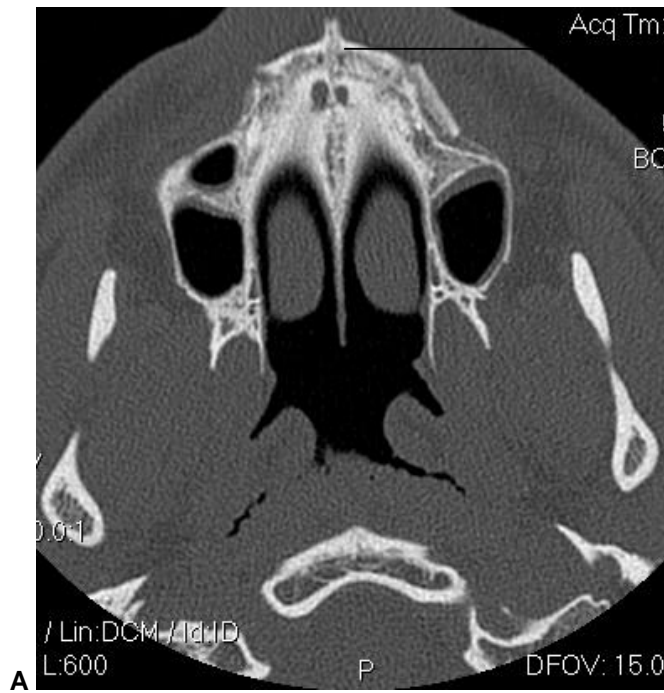
**Fig:** Analyses de la densité osseuse corticale maxillaire (A-B) et mandibulaire (C) en Unités Hounsfields du patient 40.

Patient 41



**Fig:** Coupes scannographiques transversale (A) et sagittale (B) mandibulaires, avec densité osseuse selon la classification de Lekholm et Zarb (C) du patient 41.





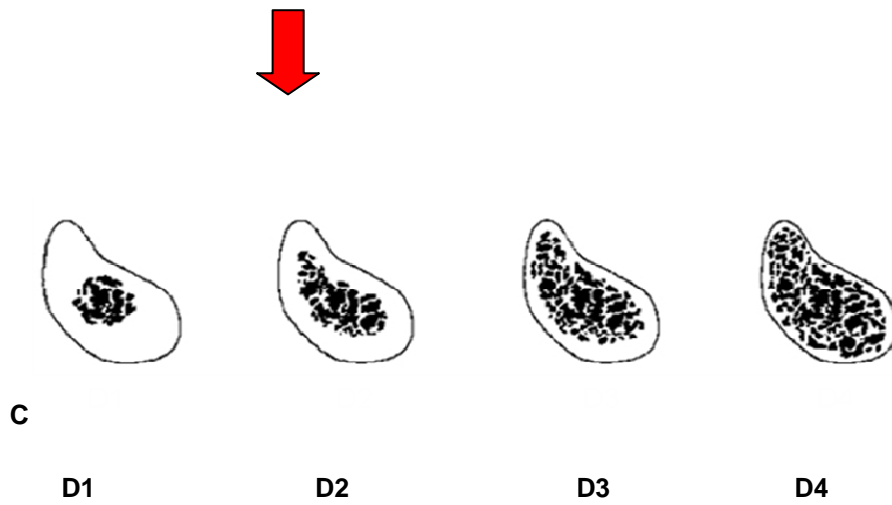
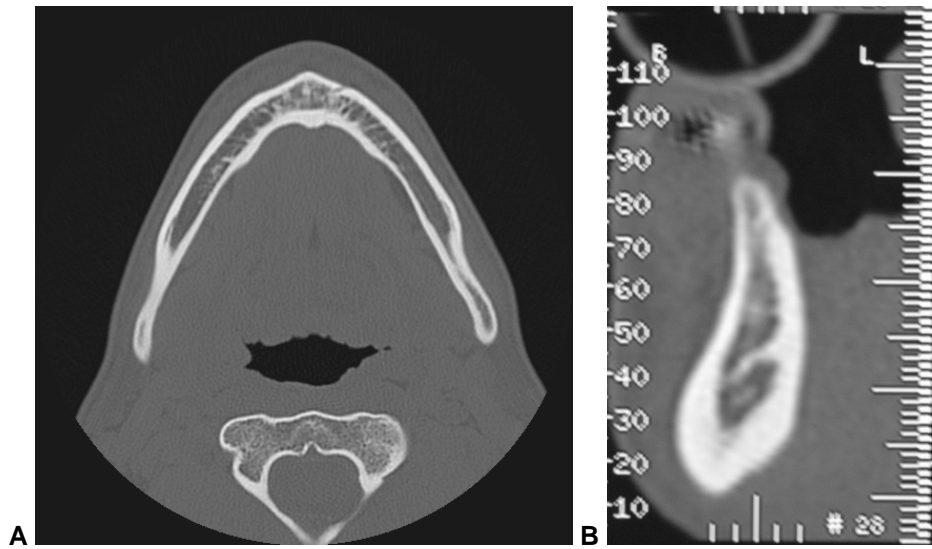
Densité corticale basale  
maxillaire : 1654 HU/835-1113



Densité corticale alvéolaire maxillaire :  
1542 HU/810-940 HU (contrôles)

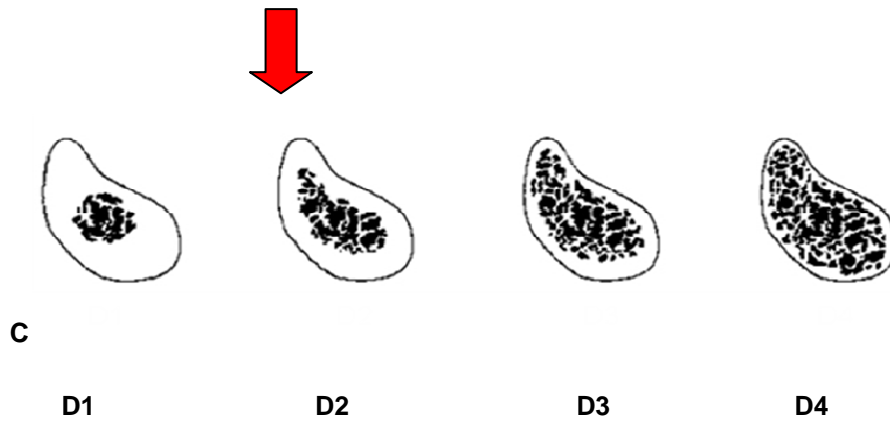
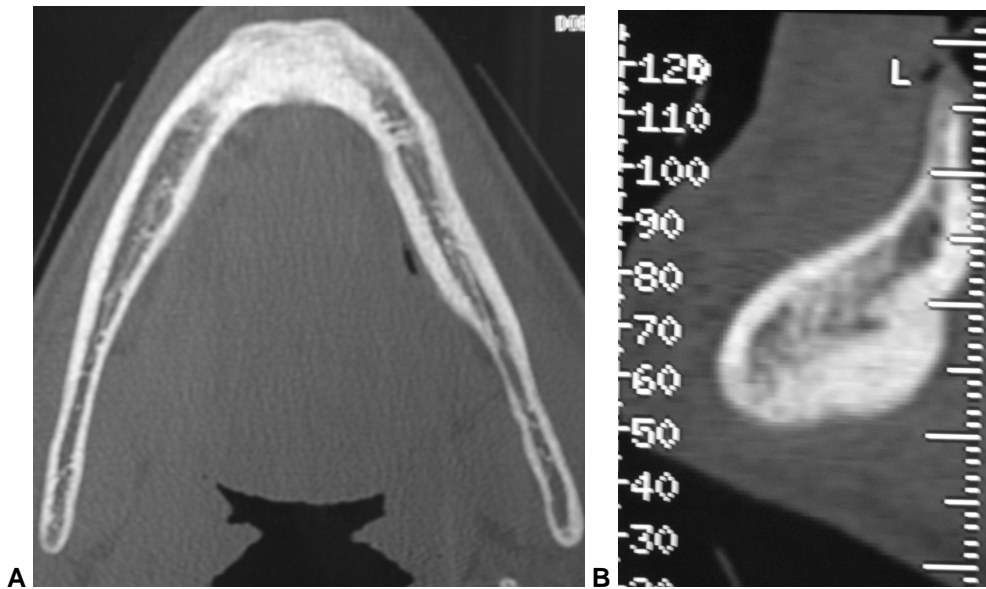
**Fig:** Analyses de la densité osseuse corticale basale (A) et alvéolaire (B) maxillaire du patient 41.

Patient 43



**Fig :** Coupes scannographiques transversale (A) et sagittale (B) mandibulaires, avec densité osseuse selon la classification de Lekholm et Zarb (C) du patient 43.

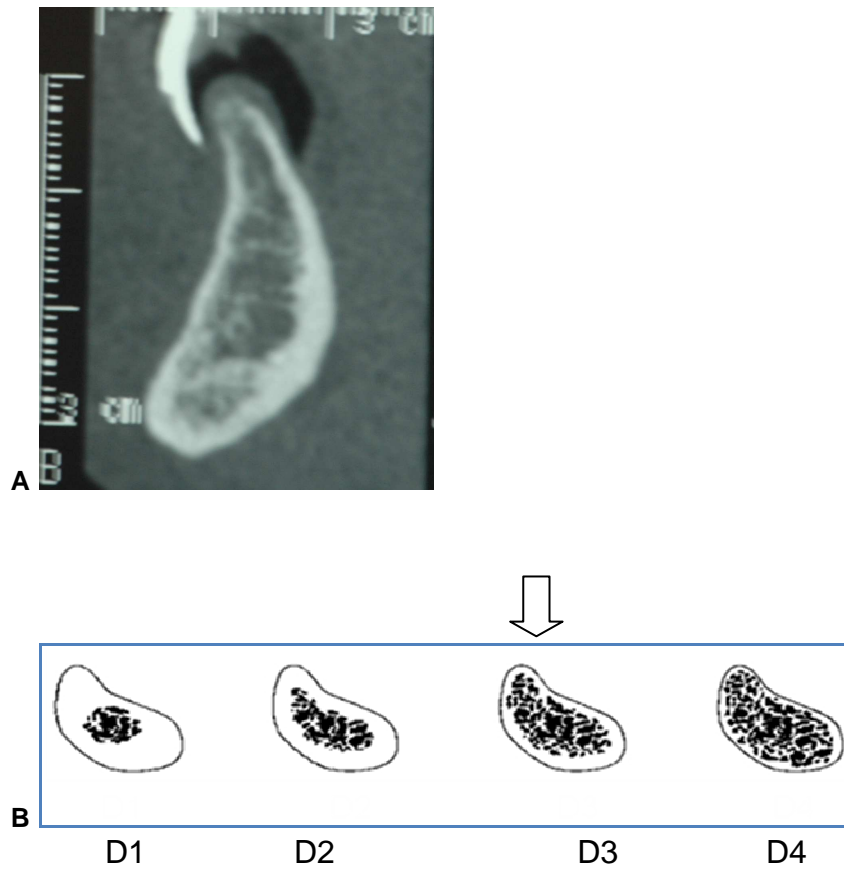
Patient 44



**Fig:** Coupes scannographiques transversale (A) et sagittale (B) mandibulaires, avec densité osseuse selon la classification de Lekholm et Zarb (C) du patient 44.

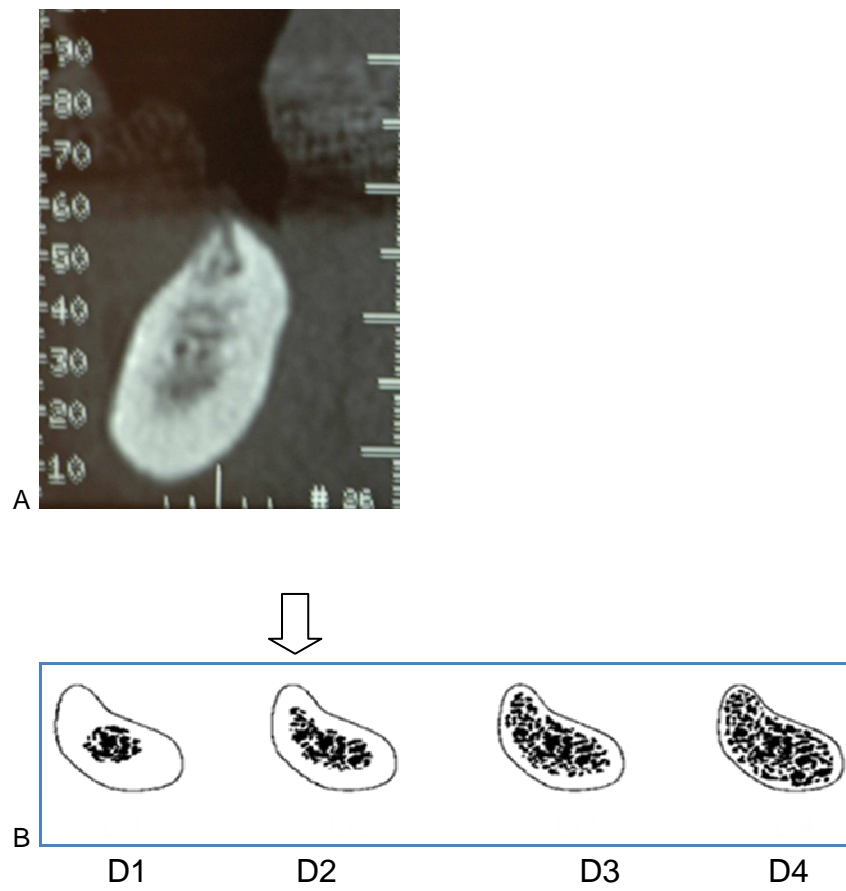
## EXAMENS SCANNOGRAPHIQUES MANDIBULAIRES DE PATIENTS CONTROLES

### Patient contrôle 1



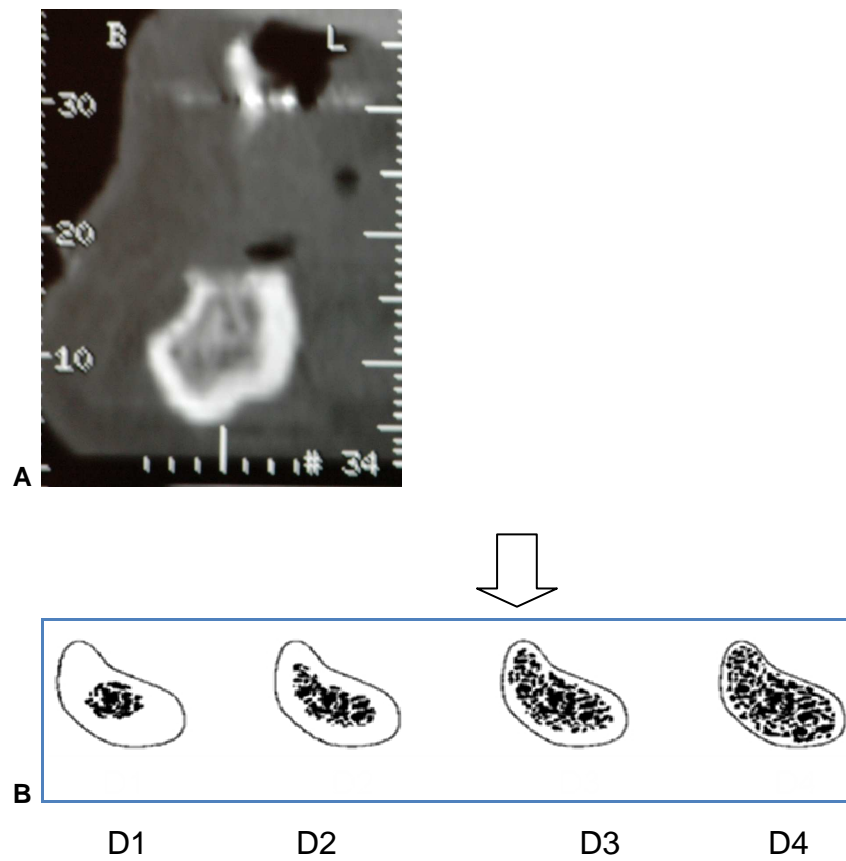
**Fig :** coupe scannographique orthoradiale de la région symphysaire mandibulaire (A) et densité osseuse selon Lekholm et zarb (B) du patient contrôle 1.

**Patient contrôle 2**



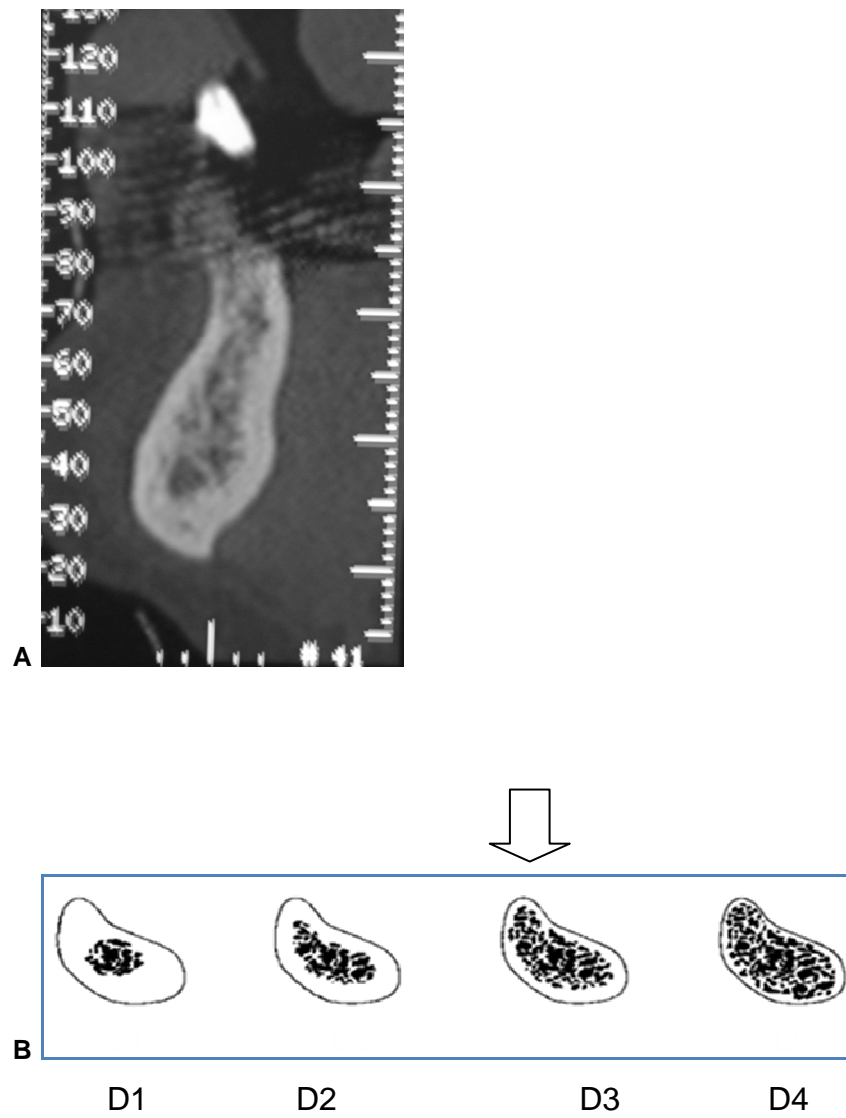
**Fig :** coupe scannographique orthoradiale de la région symphysaire mandibulaire (A) et densité osseuse selon Lekholm et zarb (B) du patient contrôle 2.

**Patient contrôle 3**



**Fig :** coupe scannographique orthoradiale de la région symphysaire mandibulaire (A) et densité osseuse selon Lekholm et zarb (B) du patient contrôle 3.

**Patient contrôle 4**



**Fig** : coupe scannographique orthoradiale de la région symphysaire mandibulaire (A) et densité osseuse selon Lekholm et zarb (B) du patient contrôle 4.