

Origine et devenir des crêtes neurales

Introduction

Les cellules des crêtes neurales (= CCNs) sont à l'origine d'un essaimage cellulaire à travers tout l'embryon et se fixent sur des zones de différenciation appelées placodes et sont ainsi à l'origine de la mise en place de multiples tissus et organes dont les dents.

Rappel : le développement embryonnaire est le résultat de la mise en place de 3 feuillets :

- **l'endoderme** à l'origine des viscères
- **le mésoderme** à l'origine des muscles et du squelette
- **l'ectoderme** à l'origine du SN et de la peau

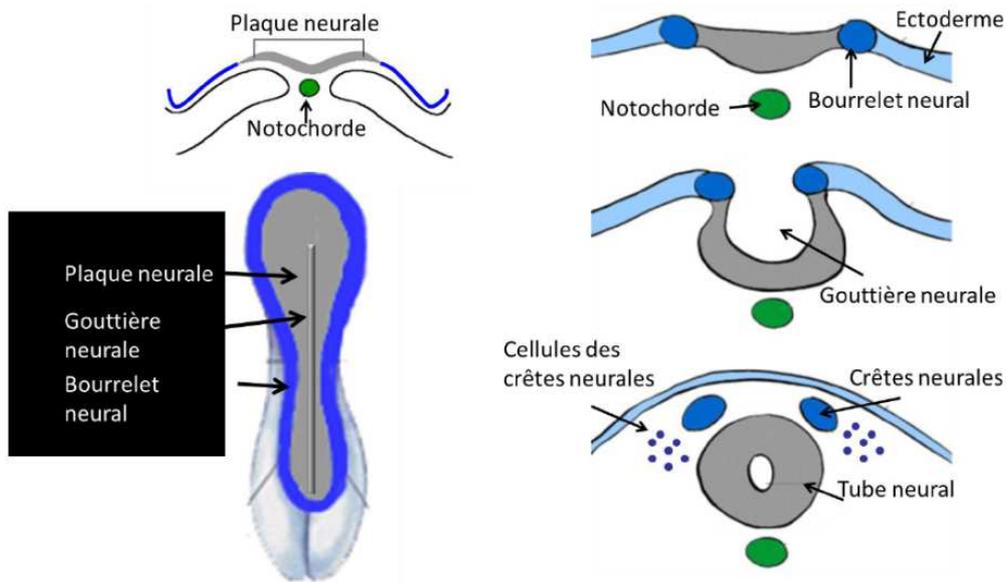
En 1868, William HIS a observé une bande de cellules située entre le tube neural et l'ectoderme : cellules des crêtes neurales mais ce n'est que dans les années 1970 que Nicole LEDOIRIN grâce à des chimères caille/poulet a mis en évidence les étapes de leur dissémination et de leur différenciation.

Objectifs du cours : comprendre l'origine, le devenir et rôle des crêtes neurales dans la formation de la dent.

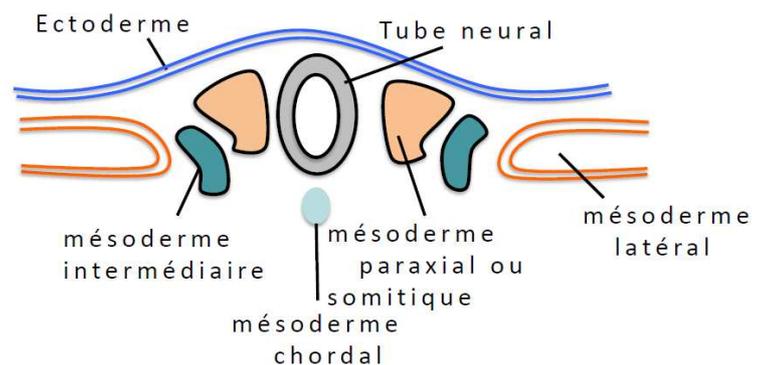
Formation et mise en place des CCNs

Vers le 21^{ème} jour du développement embryonnaire, la notochorde induit l'ectoderme sous jacent pour devenir le neuroectoderme qui sera à l'origine du tube neural et de la plaque neurale.

Macroscopiquement, le bourrelet neural délimite la plaque neurale en forme de raquette qui s'allonge dans le sens antéro-postérieur et s'invagine en formant un sillon médian qui s'appelle la gouttière neurale. Sur les vues transversales, on observe l'invagination de la gouttière neurale qui va former le tube neural et des amas de cellules se détachent des lèvres latérales de la plaque neurale constituant les cellules des crêtes neurales. **En quittant le neuroectoderme les cellules des crêtes neurales perdent leur caractère cohésif.**



Différenciation du mésoderme



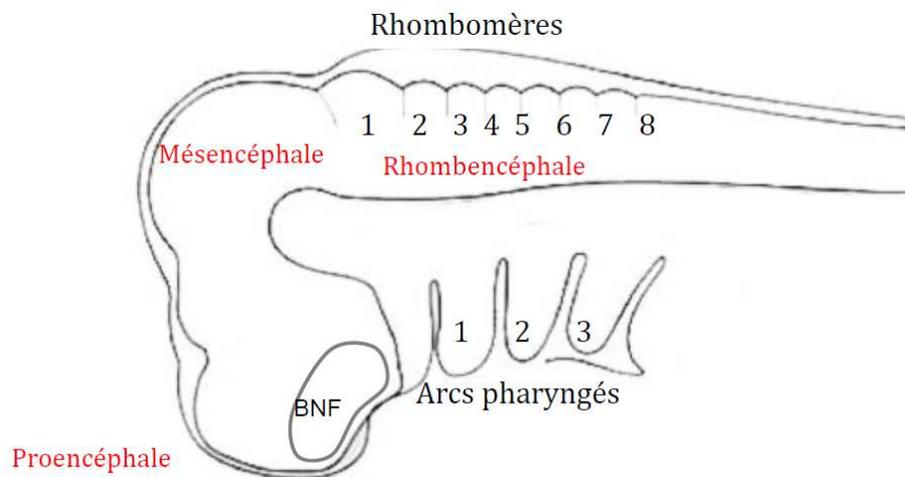
A cette même période la lame mésodermique primitive qui sépare l'ectoderme de l'endoderme se divise en trois bandes longitudinales de par et d'autre du mésoderme chordal :

- le mésoderme para axial ou somitique
- le mésoderme intermédiaire
- le mésoderme latéral qui se dédouble en deux feuillets

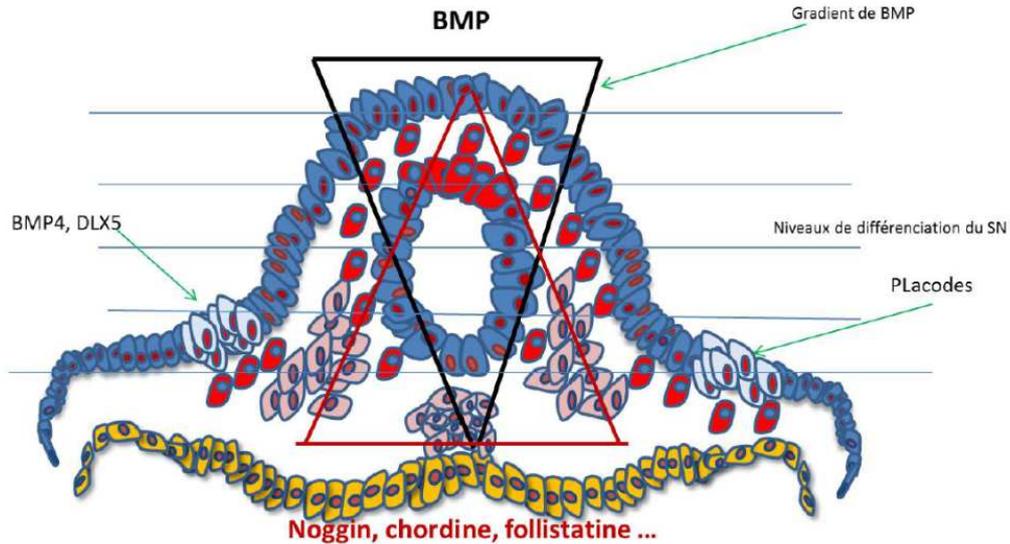
Peu avant le 25^{ème} jour, le tube neural se renfle d'avant en arrière de 3 vésicules :

- Le **proencéphale** ou cerveau antérieur avec le bourgeon naso-frontal (BNF)
- Le **mésencéphale** ou cerveau moyen
- Le **rhombencéphale** ou cerveau postérieur

La partie rostrale, c'est-à-dire la partie antérieure du rhombencéphale, montre des signes de segmentations transitoires appelées les **rhombomères**. Il y a **8 rhombomères**. A partir de ces 8 rhombomères, les CCNs vont migrer pour former des structures dupliquées qui se développent de chaque côté de la future face et du cou et fusionnent au niveau de la ligne médiane. Ces structures sont les **arcs pharyngés**.



BMP et formation des CN



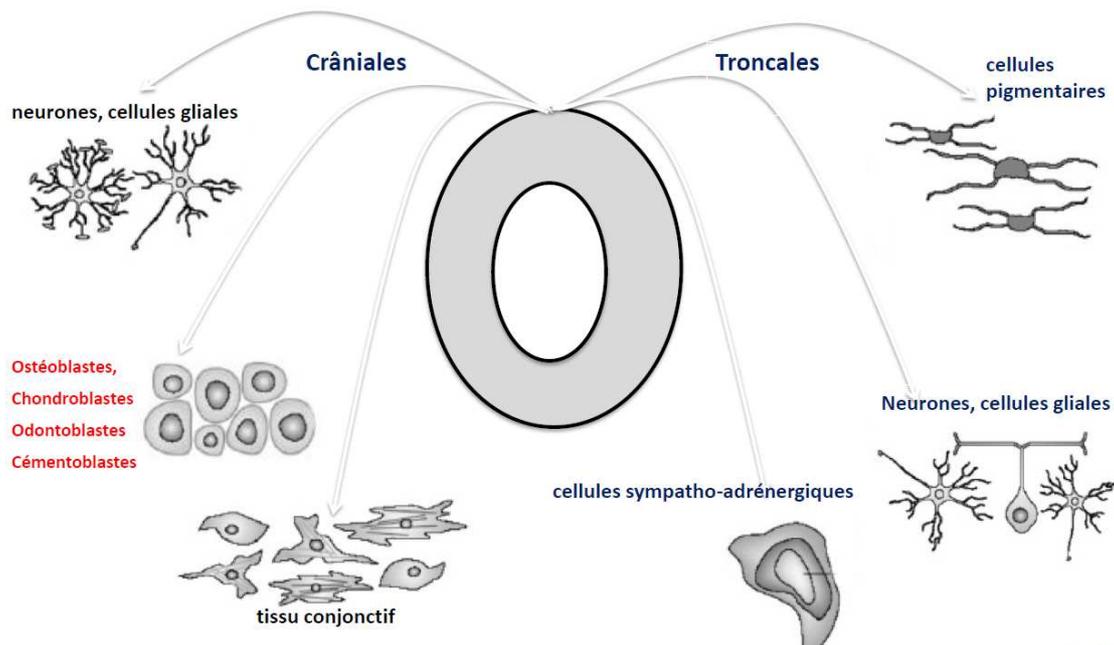
Les niveaux de BMP (Bone morphogénétique protéines) qui sont des facteurs de croissance de la famille des TGF bêta sont cruciaux pour la spécification de la plaque neurale et de la bordure neurale **donc de la crête neurale**. Les BMP, en particulier 2, 4, 5 et 8, sont présentes dans tout l'ectoderme déjà à la veille de la gastrulation (avant la formation du tube neural).

Les niveaux de BMP sont cruciaux pour la spécification (cad la différenciation du tube neural) et donc la formation de tout le SN. Les BMP sont exprimé tout le long de l'axe dorso-crânio-caudal et leurs molécules antagonistes sont produites en situation ventrale par le mésoderme et surtout par la corde. Ils établissent un gradient dorso-ventral et un gradient crânio-caudal très subtile. C'est-à-dire un champ morphogénétique spécifique et complexe qui va induire la différenciation cellulaire du tube neural. Les antagonistes de la BMP tels la chordine, Noggin, follistatine ... sont complexes et nombreux.

Les niveaux de BMP varient très peu d'un niveau à l'autre mais sont suffisants pour établir une différenciation cellulaire à chaque niveau voire d'une cellule à l'autre à l'intérieur du tube neural.

La BMP a un gradient inverse de ses inhibiteurs (antagonistes) ce qui permet de contrôler très bien les mécanismes de différenciation.

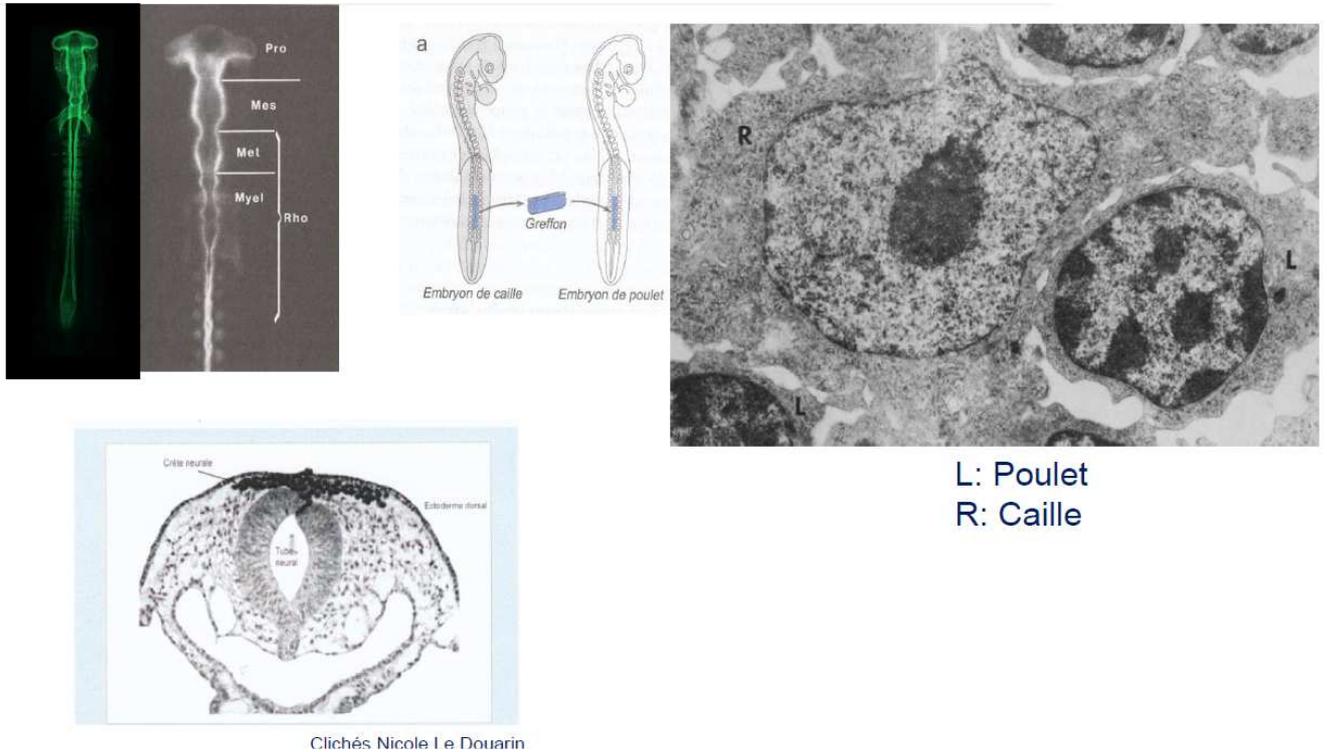
Principales structures dérivées des cellules des crêtes neurales



Les CCNs possèdent une capacité migratoire remarquable ainsi qu'une diversité phénotypique importante puisqu'elle donne naissance à de nombreux types cellulaires différenciés, incluant : les cellules pigmentaires (les mélanocytes), les neurones, les cellules gliales. Ces cellules des CN sont à l'origine de toutes les cellules du SNC mais aussi d'une grande partie des os du crane et cellules osseuses et cartilagineuse tels que la thyroïde, les poils, une grande partie des yeux, de la glande surrénale et du cœur, tout le système dentaire (dent, parodonte, **à l'exception de l'émail d'origine épithéliale**).

Ce sont des cellules pluripotentes capable de se différencier en un grand nombre de type cellulaire mais elles ont aussi une spécification : il n'y a que les cellules des crêtes neurales crâniennes qui seront capables de former les éléments du squelette crânio-facial et en particulier les dents.

Mise en évidence des CCNs



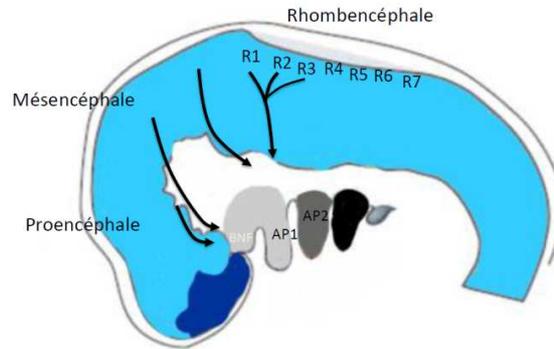
Technique de marquage vitale spécifique : suivre un type de cellule spécifique pendant toute leur migration. Les premiers marquages étaient fluorescents puis radioactifs. Le problème avec ce type de marquage c'est qu'à chaque fois qu'une cellule se divise, l'intensité du marqueur est divisée par deux (puisque l'on a mis une quantité fixe de molécules marquées). On ne pouvait donc pas suivre les cellules des crêtes neurales sur toute leur distance de migration.

Travaux de Nicole LEDOIRIN : (sur les chimères cailles/poulets) a permis de mettre en évidence les crêtes neurales et surtout leur migration et les zones où elles vont se différencier. Les chimères chirurgicales permettent de suivre des cellules étrangères jusqu'à leur lieu de différenciation. Quand on regarde ces cellules en microscopie électronique à transmission ou au microscopie optique, on voit que les cellules de caille ont toute leur chromatine regroupée autour du nucléole alors que les cellules du poulet ont une chromatine répartie sur l'ensemble du noyau. Le problème c'est que les poules n'ont pas de dents donc pour suivre la morphogénèse dentaire et le rôle des crêtes neurales on ne pouvait que faire des suppositions.

Marquage par la green fluorescence proteine (GFP) : (récent) On modifie le génome de la cellule pour qu'elle exprime cette protéine donc quand elle va se multiplier les deux cellules filles vont sécréter la même quantité de marqueur.

Régionalisation et migration des CCNs

Les cellules qui colonisent le 1^{er} arc pharyngé (AP1) dérivent de la partie postérieure du mésencéphale et des rhombomères 1, 2 et 3 du rhombencéphale.
 Les CCNs issues du pro encéphale et de la partie antérieure du mésencéphale colonisent le BNF.



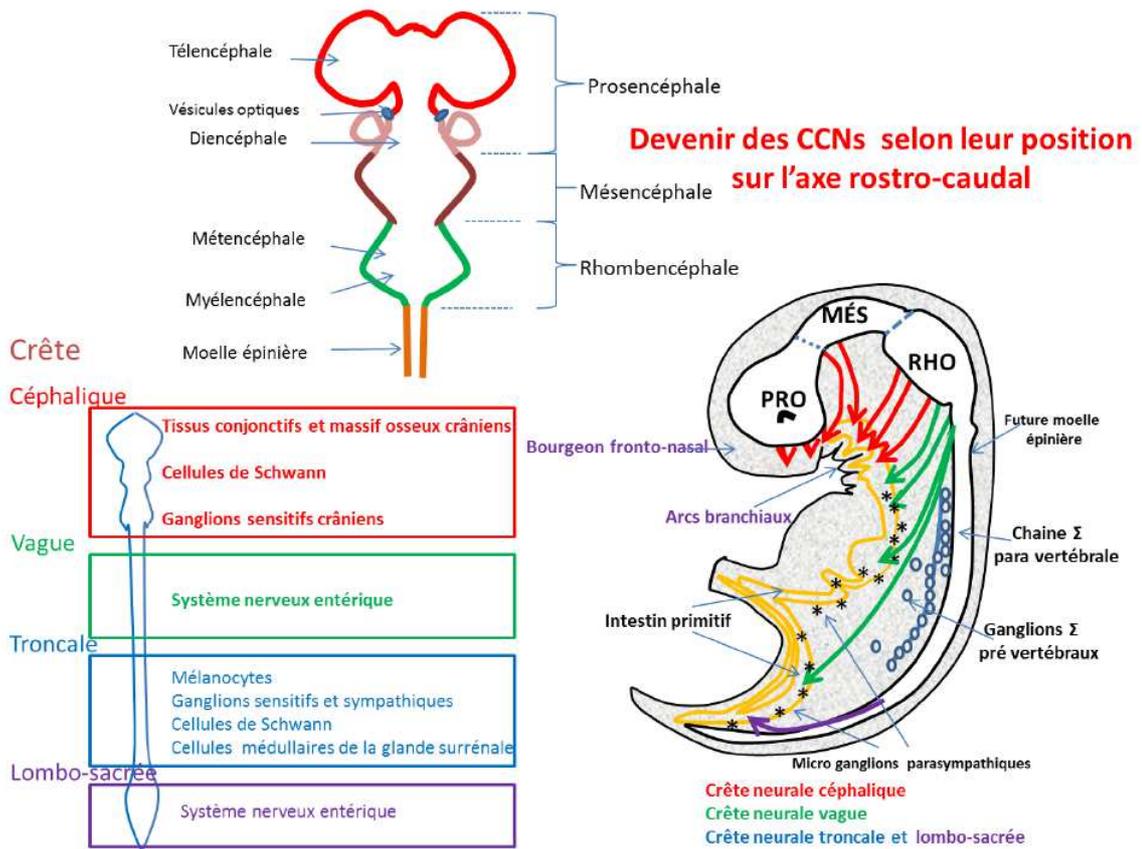
Les **cellules céphaliques** fournissent la majeure partie du tissu mésenchymateux, du squelette crânien, le SNC en totalité, le système sensitif en partie **et les dents**.

Les **cellules vagues** en arrière du rhombencéphale vont donner le système nerveux entérique (digestif).

Les **cellules troncales** fournissent les mélanocytes, les ganglions sensitifs et sympathiques, les cellules médullaires de la glande surrénale.

Les **cellules lombo-sacrées** donnent le système nerveux intestinal au niveau lombo-sacrée.

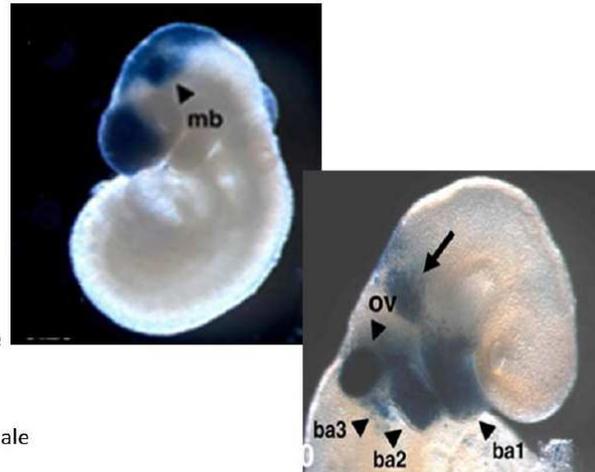
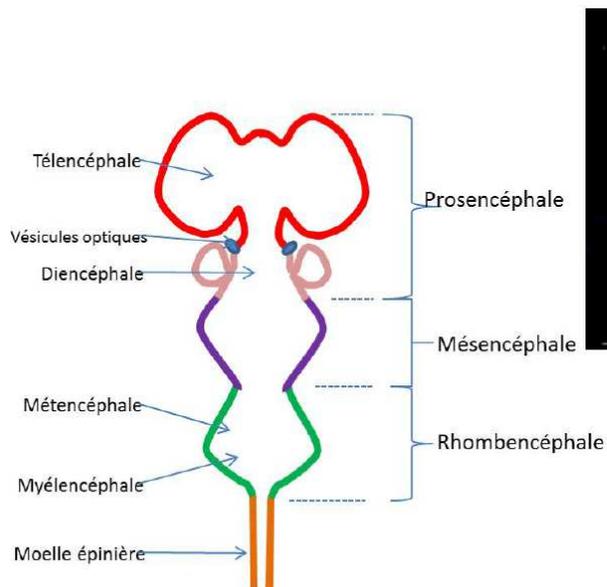
Les cellules gliales et les mélanocytes peuvent venir de l'ensemble du territoire des CCNs.



Régionalisation et migration des CCNs céphaliques

Au niveau céphalique, on retrouve le prosencéphale (télencéphale diencéphale), le mésencéphale (tubercules quadrijumeaux et les pédoncules cérébraux), le rhombencéphale (futur cerveau post, bulbe rachidien, cervelet, la protubérance annulaire).

Les cellules provenant de ces zones là vont migrer sous l'ectoderme dans le mésoderme dans des espaces peu cellulaires puis à l'intérieur des arcs pharyngiens ainsi que le bourgeon naso-frontal (BNF).



Migration dans les 1^{er}, 2^{ème}, et 3^{ème} arcs branchiaux
Vésicules otique et optique

Rôle dans la formation du germe dentaire

Expérience de 1984 d'association/réassociation (Lusden)

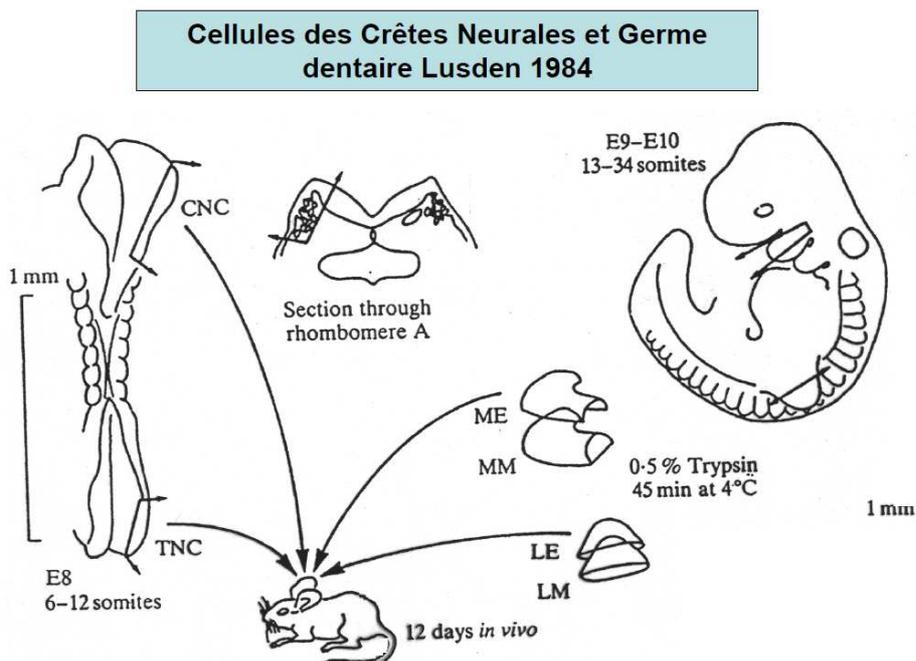
Technique :

- Chez un embryon de souris à un stade développement de 6 à 12 somites on prélève 2 zones : les cellules de la crête neurale et les cellules du trou neural avant la fermeture du tube neural complète.
- Dans un embryon plus développé de 13 à 34 somites on prélève 2 zones : le 1^{er} arc pharyngien et une ébauche de membre que l'on trempe dans la trypsine qui résorbe la membrane basale et permet ensuite grâce à des précelles de détacher l'épithélium du mésenchyme. On garde les épithéliums uniquement dans cette expérience. On réassocie les épithéliums avec les prélèvements qu'on a fait chez l'embryon plus jeune. **On met ces réassociations en culture 12 jours in vivo.**

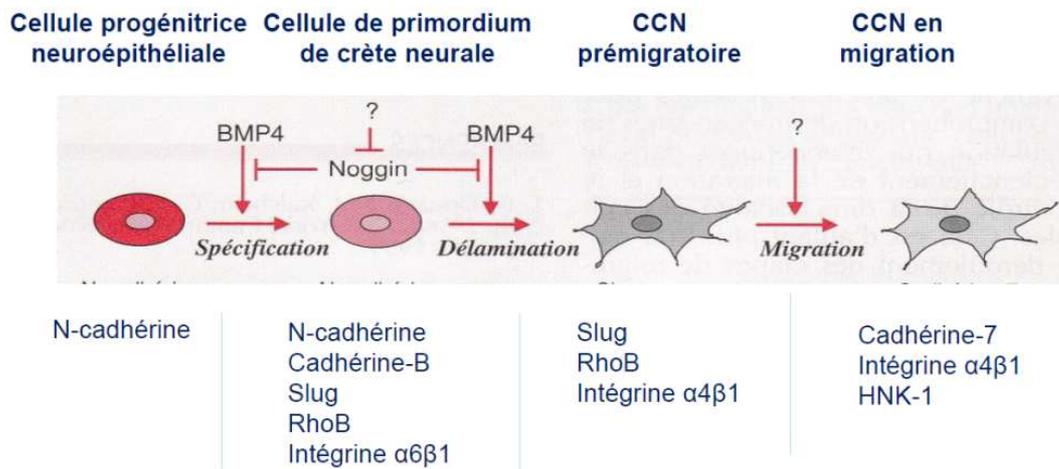
Résultats :

- ⇒ Si on met en culture l'épithélium de l'ébauche de membre seul sans le réassocier on obtient un tissu épithélial
- ⇒ Si on met des CCNs seules en culture on obtient du tissu cartilagineux et du tissu nerveux
- ⇒ Si on associe les CCNs avec l'ébauche du membre on obtient du tissu osseux, du tissu cartilagineux et du tissu nerveux
- ⇒ **Si on associe les CCNs avec le 1^{er} arc pharyngé on va obtenir du tissu osseux (du parodonte) et du tissu dentaire (dentine)**

Conclusion : Ce sont les CCNs qui sont impliquées dans la formation du tissu dentaire mais il n'y a développement d'un organe dentaire que si les CCNs sont associées avec un épithélium spécifique, compétent. **Il existe donc une information génétique au niveau de l'épithélium oral.**



Transition épithélio-mésenchymateuse



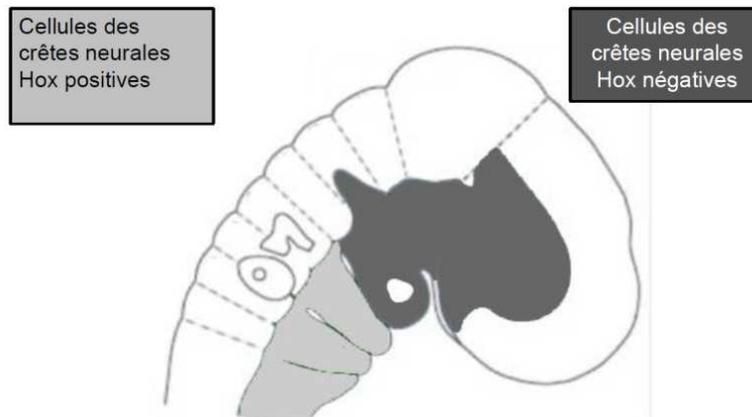
Avant leur migration, les CCNs vont subir une transition épithélio-mésenchymateuse puisque au départ ce sont des cellules qui proviennent de l'ectoderme (cellules épithéliales) : **cellules progénitrices neuroépithéliales** qui vont se transformer en **cellule de primordium de crête neurale** puis en **CCN prémigratoire** et enfin en **CCN migratoire**. On va passer d'un morphotype épithélial à un phénotype mésenchymateux. Les étapes aboutissant aux CCNs prémigratoires sont sous la dépendance de la BMP4 qui va contrôler la **spécification** puis la **délamination**. Avec leur transformation, les CCNs modifient leurs sécrétions. Au départ, les cellules pro génitrices sécrètent des protéines typiques des cellules épithéliales : la N-cadhérine, puis sous l'action de la BMP4 on a l'expression de 2 gènes : Slug et RhoB, puis on a une disparition de la sécrétion de N-cadhérine au niveau des CCN prémigratoire. L'intégrine $\alpha 4 \beta 1$ est une protéine spécifique des cellules mésenchymateuses.

Cette transition épithélio-mésenchymateuse est valable pour tous les mésenchymes et pas uniquement la dent. Elle est responsable de la formation de certains cancers comme le cancer du foie (hépatocytes qui redeviennent des cellules mésenchymateuses).

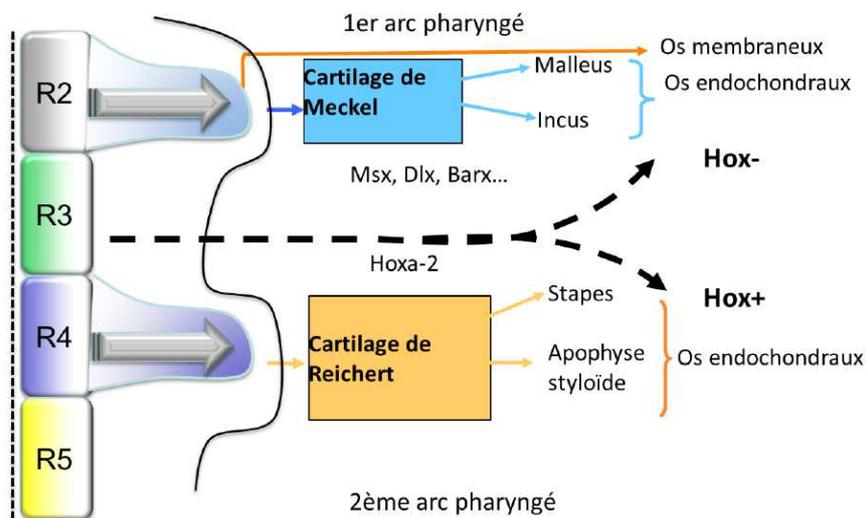
- **Les cellules épithéliales** sont principalement caractérisées par les molécules d'adhésion : les E-cadhérines, les claudines, les occludines, les desmoplakines, les cytokératines 8, 9, 18 et la mucine.
- **Les cellules mésenchymateuses** (ex : les fibroblastes) sont caractérisées par : la fibronectine, la vimentine, la vitronectine, des filaments d'actines, une protéine spécifique FSP1, des récepteurs au FGF en particulier le FGFR 2 (sur la membrane cytoplasmique des fibroblastes).

La transition épithélio-mésenchymateuse peut se faire dans les deux sens.

Contrôle génétique



Il existe des marqueurs moléculaires contemporains des processus de morphogénèse qui sont exprimées de façon segmentaire et qui vont respecter les limites morphologiques entre les rhombomères et les arcs pharyngés. Parmi ces gènes du développement on compte les gènes Hox (les plus connus) et qui sont groupés en complexes suivant l'axe rostro-caudal de l'embryon. **Néanmoins les cellules de crêtes neurales issues des rhombomères 1 et 2 n'expriment pas de gène Hox (Hox négatives) et vont coloniser le BNF et le 1^{er} arc pharyngien (responsable de la formation dentaire).** Les cellules issues des autres rhombomères vont exprimer le gène Hox.

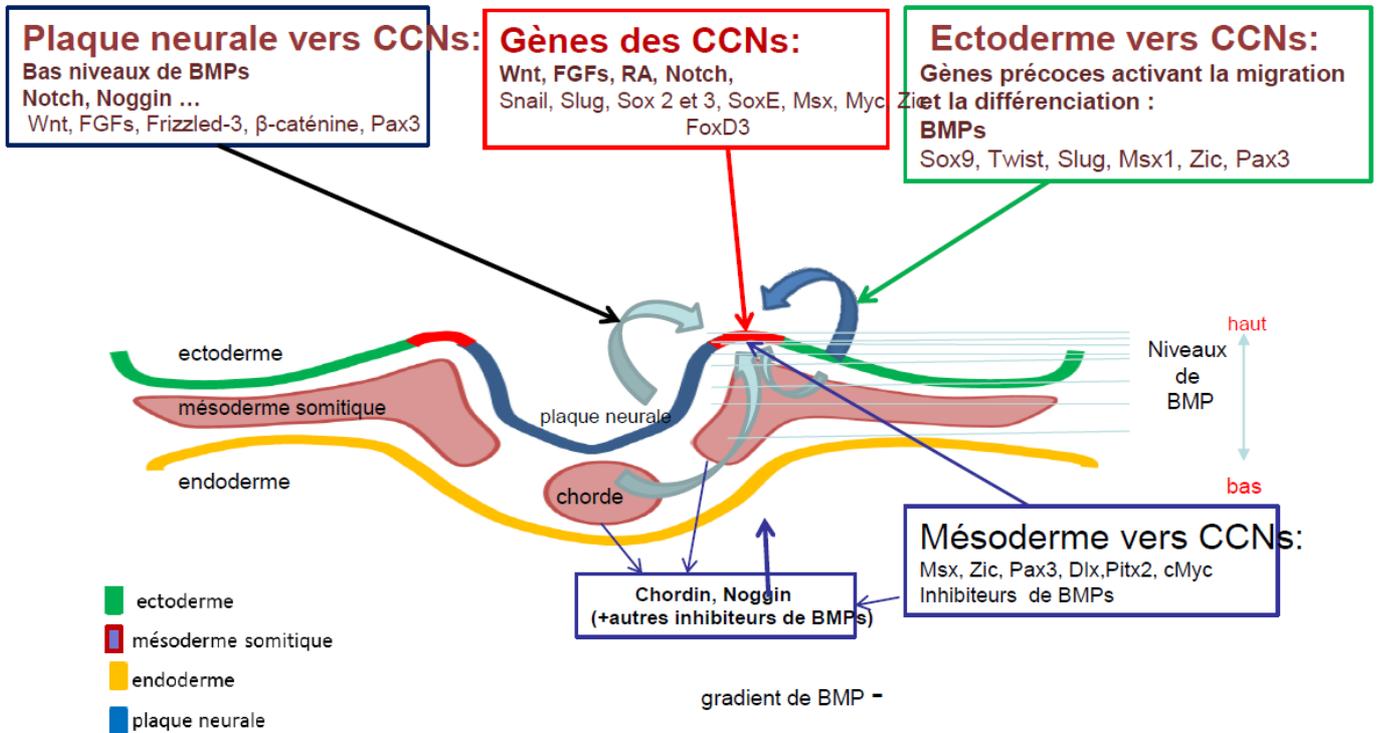


Les CCNs issues du rhombomère 2 vont coloniser le 1^{er} arc pharyngé et vont donner le cartilage de Meckel qui va donner par ossification le malleus et l'incus (os endochondraux ou enchondraux). Le rhombomère 2 va aussi produire tous les os membraneux de la face. Il y a à ce niveau expression de gènes Hox divergents tels Msx, Dlx, Barx...

Au niveau du 2^{ème} arc pharyngé non concerné par la formation de l'organe dentaire il y a expression du premier gène Hox (le plus antérieur) qui est Hoxa-2. Les cellules des crêtes neurales issues du rhombomère 4 vont donner le cartilage de Reichert qui va donner l'apophyse styloïde et le stapes (os du système auditif). Ce sont des os enchondraux.

Gènes et facteurs impliqués dans la spécification des CCNs

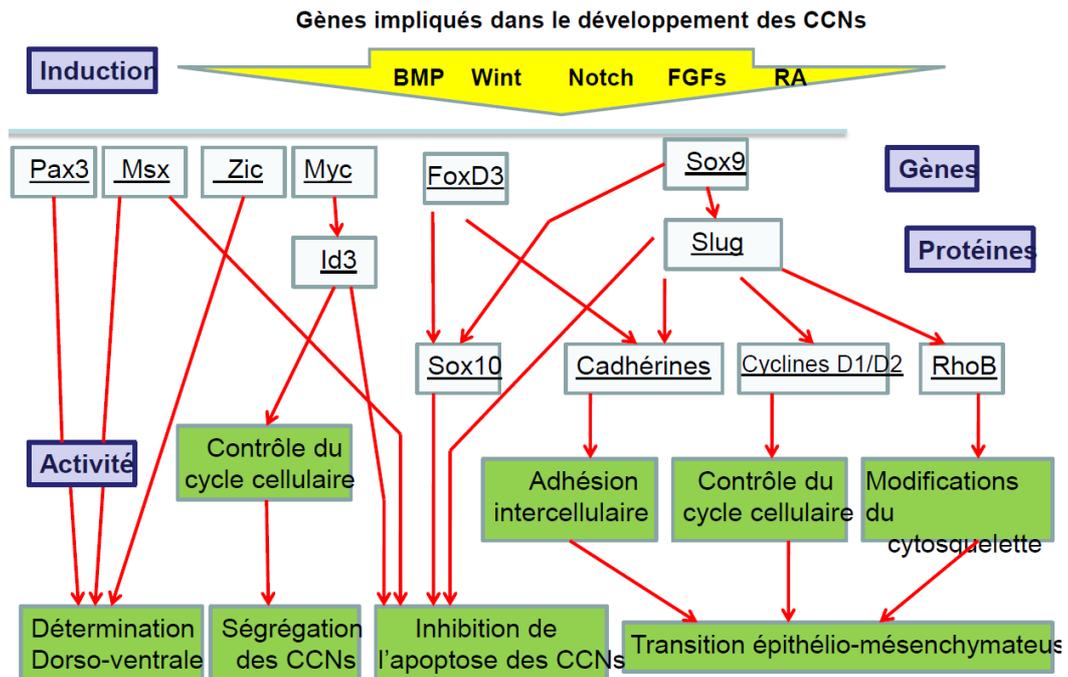
Influences de la zone frontière sur la compétence des cellules crestales :



Au premier stade de spécification (stade d'activation) des crêtes neurales, les gènes précoces (qui expriment des facteurs de transcription pour la plupart) sont Sox9, Twist, Slug (= Snail), Msx1, Zic et Pax3. Ils sont activés de manière séquentielle par des signaux qui proviennent du mésoderme, de l'ectoderme et des crêtes neurales elles même. On a toujours le champs morphogénétique des BMP 2, 4, 5 et 8 qui s'exprime de manière très faible au niveau de la plaque neurale et de manière beaucoup plus forte au niveau de l'ectoderme. On a d'autres activateurs d'activation cellulaire comme le gène du FGF, le gène Wnt, l'acide rétinoïque et le gène Notch.

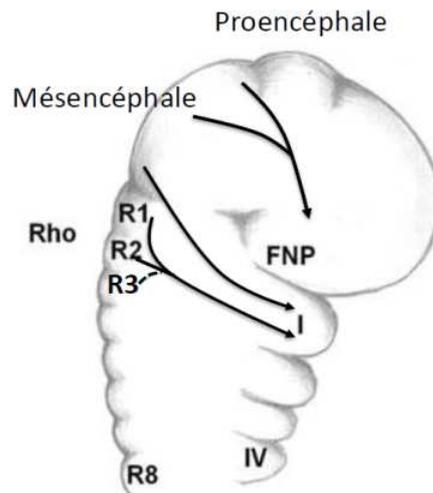
Résumé : Les gènes impliqués dans le développement des CCNs

L'induction des mécanismes de formation des CCNs se fait grâce aux BMP (à l'exception de BMP3), Wnt, Notch, les FGFs et l'acide rétinoïque. D'autres gènes vont assurés le contrôle du cycle cellulaire, l'adhésion intercellulaire et les modifications du cytosquelette (la majorité des gènes ont plusieurs fonctions). Tout ceci va entrainer la détermination dorso-ventrale de la différenciation des CCNs, la ségrégation des CCNs en fonction de l'axe rostro-caudal, l'inhibition de l'apoptose des cellules des crêtes neurales (maintien de la population) et la transition épithélio-mésenchymateuse.



Conclusions

Les CCNs colonisent le bourgeon naso-frontal. Elles proviennent de la partie postérieure du proencéphale et la partie antérieure du mésencéphale. Ce sont les CCNs de la partie postérieure du mésencéphale et des rhombomères 1, 2 du rhombencéphale qui colonisent le 1^{er} arc pharyngé et qui vont donner naissance à l'organe dentaire.



On trouve dans la pulpe de la dent des cellules mésenchymateuses qui sont encore des descendantes des crêtes neurales ce qui nous permet de développer des thérapies en utilisant ces cellules multipotentes qui peuvent se différencier en cellules cardiaques, en neurones ou reformer la cornée (première application chez l'homme en 2010). Ces cellules souches ont beaucoup plus de potentialité que les cellules souches stromales de la moelle osseuse et les adipocytes par exemple.