

Interactions épithélio-mésenchymateuses dans l'odontogénèse

But du cours : montrer les concepts qui ont dominés l'embryologie avant que la régulation moléculaire de l'odontogénèse s'impose il y a 10/15 d'années. (Les régulations moléculaires de l'odontogénèse seront traitées dans le cours qui suit). Il faut rappeler que les interactions épithélio-mésenchymateuses dans les développements des organes ont toujours été un domaine clé et ça s'est construit sur une série d'expériences qui ont permis de comprendre exactement le rôle des différents tissus et leurs interactions.

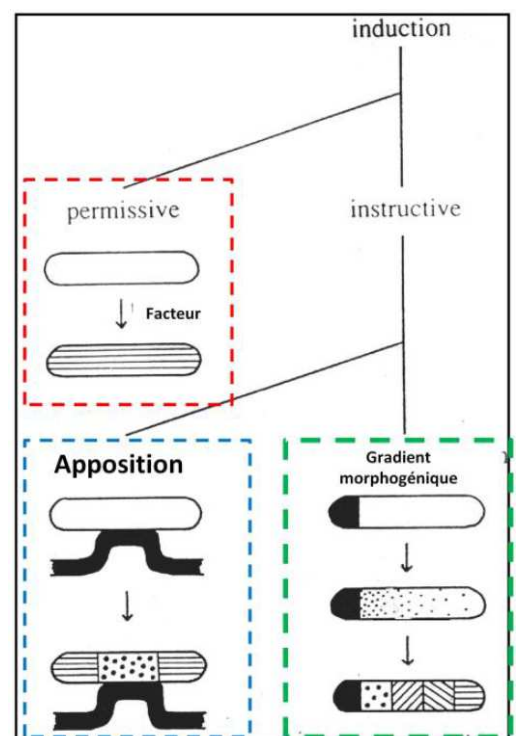
Les inductions instructives et permissives

Au niveau du rectangle rouge on a **les inductions permissives** : c'est un facteur inducteur qui ne modifie pas l'engagement tissulaire mais permet au tissu de s'engager dans une voie où il aurait dû s'engager. Donc on ne va pas, par exemple, entraîner une modification épithélio-mésenchymateuse par contre si un tissu qui est en place est appelé à se développer plus fortement dans la morphogénèse c'est dû à une induction permissive.

Les inductions instructives par opposition (carré en bas vert et bleu) sont de 2 types. Ces inductions vont modifier l'engagement du tissu **dans une voie spécifique**. Le signal instructif peut provenir de 2 mécanismes différents : ça peut être dû à une molécule diffusible qui va traverser une portion de l'embryon. On va définir ce domaine traversé **comme un champ morphogénique**. Dans ce champ morphogénique on aura des gradients de molécules instructives différentes. Donc en suivant ce gradient (carré en bas à droite où il y a des différences de densité de points) on aura la mise en place de tissus, d'organes différents. Dans notre cas on pourra avoir par exemple passage des incisives à molaires, première molaire, deuxième molaire, troisième molaire... par des diffusions différentes de molécules instructives.

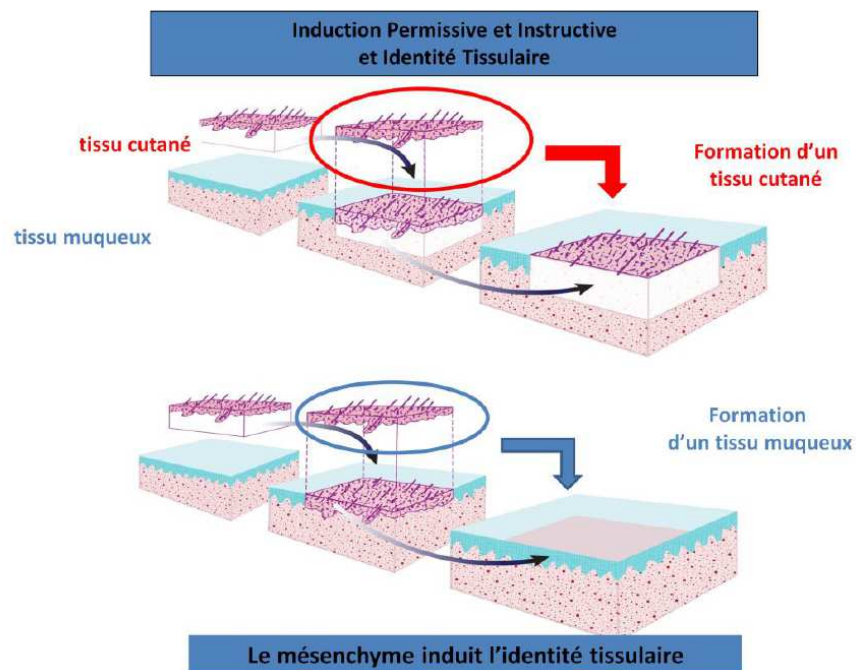
Ce signal instructif peut être dû également au contact entre 2 tissus. C'est ce que l'on voit dans le carré bleu (en bas à gauche) où le contact entre ces 2 tissus va imposer une modification du tissu.

Pour différencier les inductions instructives dues à une diffusion ou à un contact il suffit de faire des expériences d'association-réassociation en mettant entre les tissus un filtre qui empêche des molécules de passer.



Ces interactions épithélio-mésenchymateuses sont connues grâce à des expériences de dissociation-réassociation dont on a déjà parlé dans les cours précédents. La base du mécanisme est d'utiliser une enzyme, **la trypsine** pour dégrader la membrane basale qui sépare les 2 tissus et on peut juste après, en exerçant une force mécanique et en tirant sur les 2 tissus avec des précelles, les séparer. On peut ainsi réassocier des tissus qui ont différentes origines, différents temps, qui n'ont pas la même durée de développement embryonnaire pour voir quel tissu va induire un changement dans l'autre tissu (où se trouve le mécanisme inducteur).

Ces expériences d'association-réassociation, si elles permettent bien de voir quel est le tissu responsable de l'instruction, ne permettent pas de déterminer le type de molécule. Donc en fait on a contourné ce problème en imbibant des particules ou des sphères, avec des molécules, des facteurs de croissance, des molécules inductives pour voir quelle était la molécule qui était en jeu.



Un exemple de fonctionnement de ces expériences d'association-réassociation avec 2 tissus de recouvrement :

- **Un tissu cutané** caractérisé par la présence de poils, de glandes sudoripares (ici tissu en rose)
- **Une muqueuse de recouvrement** dont la structure est un kératinisé ou non kératinisé où il n'y a pas de glandes sébacée ou de poils. (partie haute de la diapo).

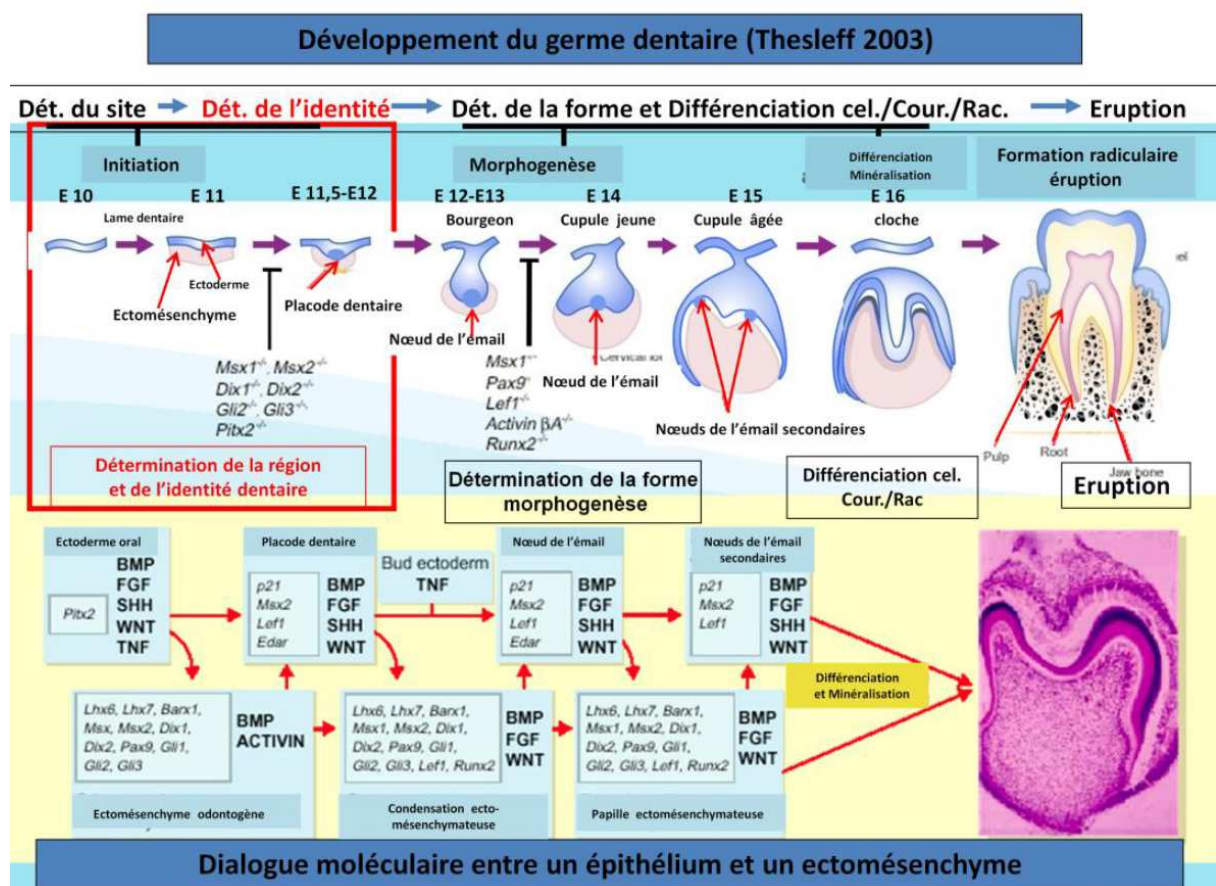
Si dans le tissu muqueux on découpe une fenêtre dans laquelle on met l'ensemble du tissu cutané, que l'on met ces tissus en culture, on va garder notre phénotype tissu cutané : c'est-à-dire que l'on va garder les poils et les glandes sudoripares.

Si l'on fait une expérience similaire c'est-à-dire que l'on va utiliser toujours un tissu muqueux mais que l'on ne greffe que la partie épithéliale sur ce tissu muqueux et que l'on remet en culture, on va obtenir un tissu muqueux uniquement.

Ce qui veut dire que l'information, l'identité tissulaire, est contenue dans le mésenchyme à ce stade. Il y aura une induction mésenchymateuse pour transformer le tissu épithélial où il y avait des poils et des glandes sudoripares en un tissu épithélial de recouvrement de muqueuse.

Dans le domaine de l'odontogénèse on a 3 grandes parties :

- La 1^{ère} partie est la **régionalisation de l'arc pharyngé**
- La 2^{ème} partie est le **stade d'initiation** : il comprend la **détermination du site dentaire** et l'**identité dentaire dans ce site**
- La 3^{ème} partie : **étapes de la morphogénèse** avec la détermination de la morphologie dentaire, la différenciation cellulaire, la minéralisation tissulaire qu'on verra en particulier à la fin du cours sur l'amélogénèse et la dentinogénèse

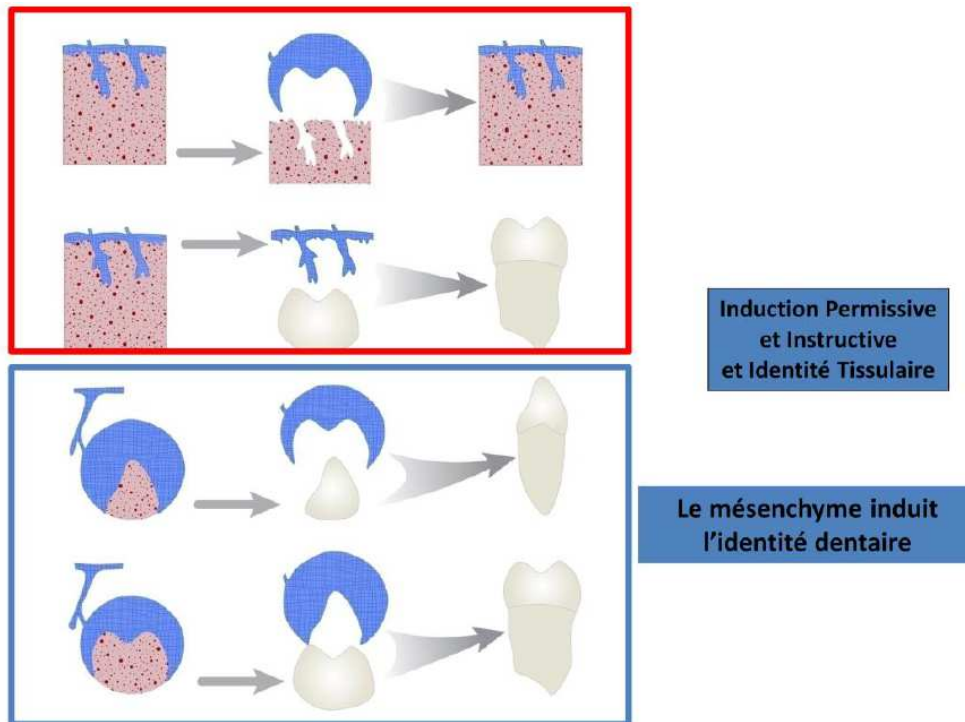


Vue relativement récente de ces différentes étapes et des facteurs qui interviennent dans le dialogue épithélio-mésenchymateux.

Dans ce cours on verra principalement ce qu'il y a dans le carré rouge : c'est la détermination de la région et de l'identité dentaire, ce qui chez la souris correspond à un passage de 10 jours de développement embryonnaire à 11/12 jours de développement. On va avoir à ce moment-là apparition de la placode dentaire sous l'effet de gènes, que l'on verra en détail. Puis dans la dernière étape du cours d'aujourd'hui (partie droite de la diapo en dehors du carré rouge) on verra l'influence des interactions épithélio-mésenchymateuses sur la morphogénèse.

Sans rentrer dans les détails, on voit que l'on retrouve des molécules de signalisation qui sont toujours à peu près les mêmes qui sont produites au niveau de l'ectoderme : BMP, FGf, SHH, WINT et TNF. Au niveau du mésenchyme on retrouve les BMP et l'activine dans le stade initial puis on va trouver BMP, FGF et WINT.

Pour l'organe dentaire, on a conduit des expériences d'association-réassociation dans les années 60 à 80. L'expérience (dans le carré rouge) a consisté à des réassociations de tissus de la peau avec des tissus de l'organe dentaire : ici (en bleu) **un tissu épithélial cad le futur organe de l'émail** et du **mésenchyme de peau** (rose). Lorsqu'on le remet en culture on obtient de la peau. A ce stade là, si on réassocie un épithélium de la peau avec la papille mésenchymateuse dentaire, on obtient une dent. On voit bien qu'à ce stade de développement l'information est contenue de la partie mésenchymateuse. **On sait qu'en fait il s'agit d'un tissu ecto-mésenchymateux** car l'on retrouve des cellules originaires de la crête neurale.



La régionalisation du 1^{er} arc pharyngé

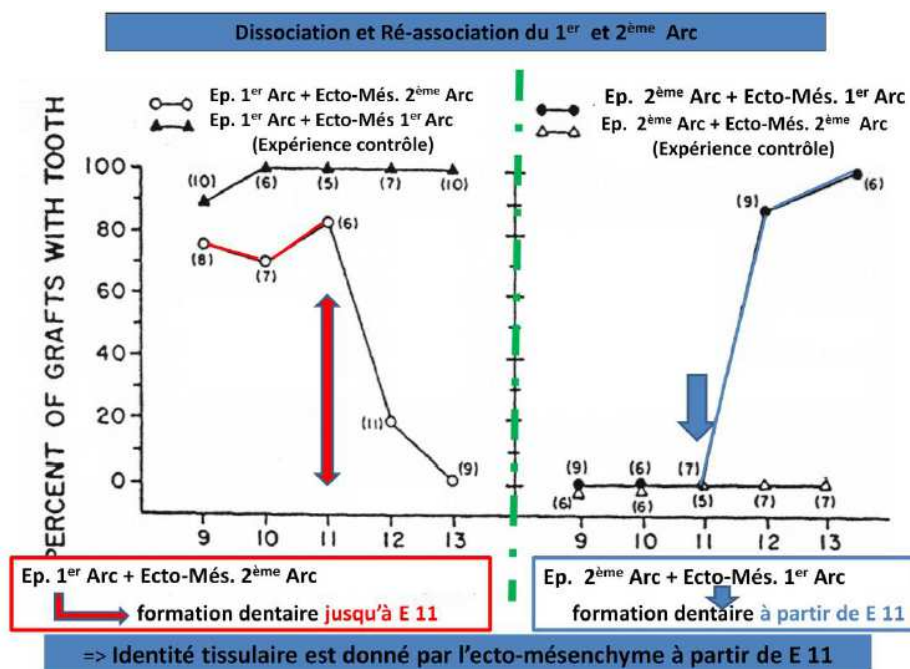
Elle a été montrée par des expériences réalisées par Lumsden. Il a montré que si l'on associait-réassociait un épithélium du 1^{er} arc avec un épithélium du 2^{ème} arc en fonction de la chronologie on n'avait pas le même succès dans la production de dents. L'échelle sur la gauche correspond au pourcentage de greffons qui vont donner une dent.

Dans la première expérience, l'expérience contrôle, si l'on prend un épithélium du 1^{er} arc pharyngé avec un ectomésenchyme du 1^{er} arc pharyngé, **dans à peu près 100% des cas on va réussir à faire une dent jusqu'à un stade de développement 11 de l'embryon.**

Dans l'expérience de réassociation du 1^{er} arc avec un ectomésenchyme du 2^{ème} arc (courbe avec les ronds), on voit qu'on a une transition très forte du nombre de dents formées : **à partir du 11^{ème} jour où l'on ne va plus arriver à former de dents. Ca nous montre bien qu'à partir du 11^{ème} jour, la formation dentaire dépend de la présence d'un ectomésenchyme du premier arc.**

Maintenant les expériences inversées : on associe un épithélium du 2^{ème} arc avec soit l'ectomésenchyme du 1^{er} arc (courbe avec les points noirs) soit l'épithélium du 2^{ème} arc avec l'ectomésenchyme du 2^{ème} arc pharyngé, c'est l'expérience contrôle (en bas → trait horizontal).

Conclusion : le 2^{ème} arc pharyngé n'est pas capable de donner de dents. Par contre à partir du 11^{ème} jour on s'aperçoit que si l'on a greffé un ectomésenchyme du 1^{er} arc on va commencer à former des dents. Donc cette expérience montre qu'au 11^{ème} jour du développement de l'embryon de souris, **l'induction instructive bascule et passe de l'épithélium à l'ectomésenchyme.**

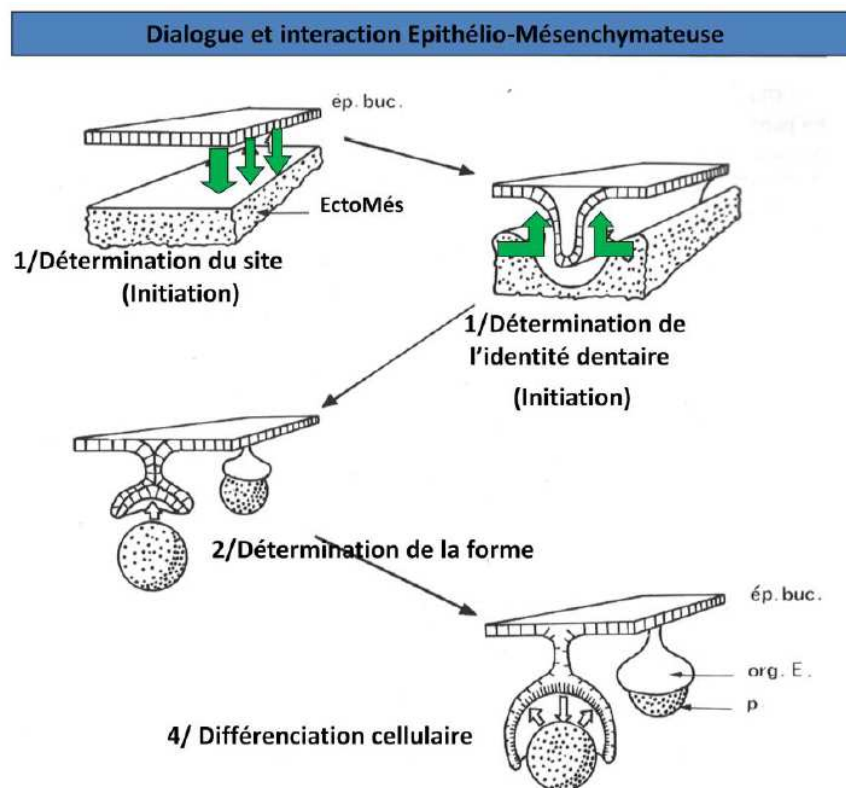


Le même type d'expérience mais l'on se focalise sur le 1^{er} arc pharyngé et l'on sépare la partie rostrale de la partie caudale entre le jour 9 et le jour 10 de développement embryonnaire. On voit que le 1^{er} arc pharyngé se régionalise à ce moment là. Dans la partie rostrale c'est du jour 8 au jour 10 que l'épithélium joue un rôle inducteur. A partir du 11^{ème} jour c'est l'ectomésenchyme qui devient inducteur à son tour. **On a donc la régionalisation du 1^{er} arc pharyngé qui apparaît dans cette fenêtre entre le 8^{ème} et le 9^{ème} jour avec l'épithélium qui joue un rôle inducteur.**

En résumé sur le stade d'initiation

En utilisant uniquement des expériences d'association-réassociation, hétérotopiques et hétérochroniques, on peut en conclure que **les placodes dentaires proviennent d'un dialogue entre un épithélium et un ectomésenchyme** avec 3 périodes :

- La période d'initiation qui se traduit par une régionalisation et une segmentation du 1^{er} arc pharyngé avec détermination du site odontogénique et la formation des placodes dentaires
- Enfin on aura des interactions épithélio-mésenchymateuses qui vont permettre la détermination de la forme de l'organe dentaire
- Cette morphogénèse donnera la nature, la fonction de la future dent, donc une incisive ou une molaire en fonction de l'endroit où elle se forme



Détermination de la morphologie dentaire

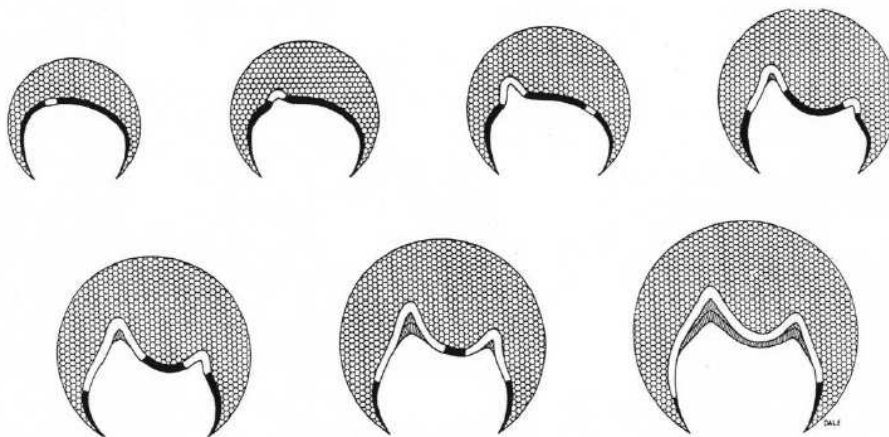
La morphologie dentaire se détermine au stade de la cloche. L'organe de l'émail s'est organisé avec différentes couches cellulaires et structures à l'intérieur :

- Un épithélium dentaire externe
- Un réticulum étoilé (résille sur le schéma)
- Un stratum intermédiaire qui a une structure cellulaire qui se situe entre le réticulum étoilé et l'épithélium dentaire interne
- Un épithélium dentaire interne

A un moment du développement il va y avoir l'apparition d'une structure qui s'appelle un **nœud de l'émail**. Ce nœud de l'émail correspond à des cellules qui ne prolifèrent plus et qui sortent du cycle mitotique. Les cellules de part et d'autre de ces zones vont continuer à proliférer. Donc au tout début quelques cellules quittent leur activité de prolifération mais les cellules (en noir) de l'épithélium dentaires continuent à proliférer.

On a donc un mécanisme de croissance différentielle. Il va se former un repli qui va devenir de plus en plus important (plusieurs replis possibles). Chaque repli va correspondre à la cuspide d'une dent. Sur le schéma on a une dent avec 2 cuspides où on voit apparaître dans un second temps un 2^{ème} nœud de l'émail (3^{ème} schéma du haut) qui va se développer avec le même mécanisme que l'autre **mais comme il y a une différence chronologique on va définir une morphologie dentaire qui va être caractérisée par une cuspide vestibulaire plus prononcées que la cuspide palatine.**

Morphologie et Cinétique de Formation des Pointes Cuspidiennes

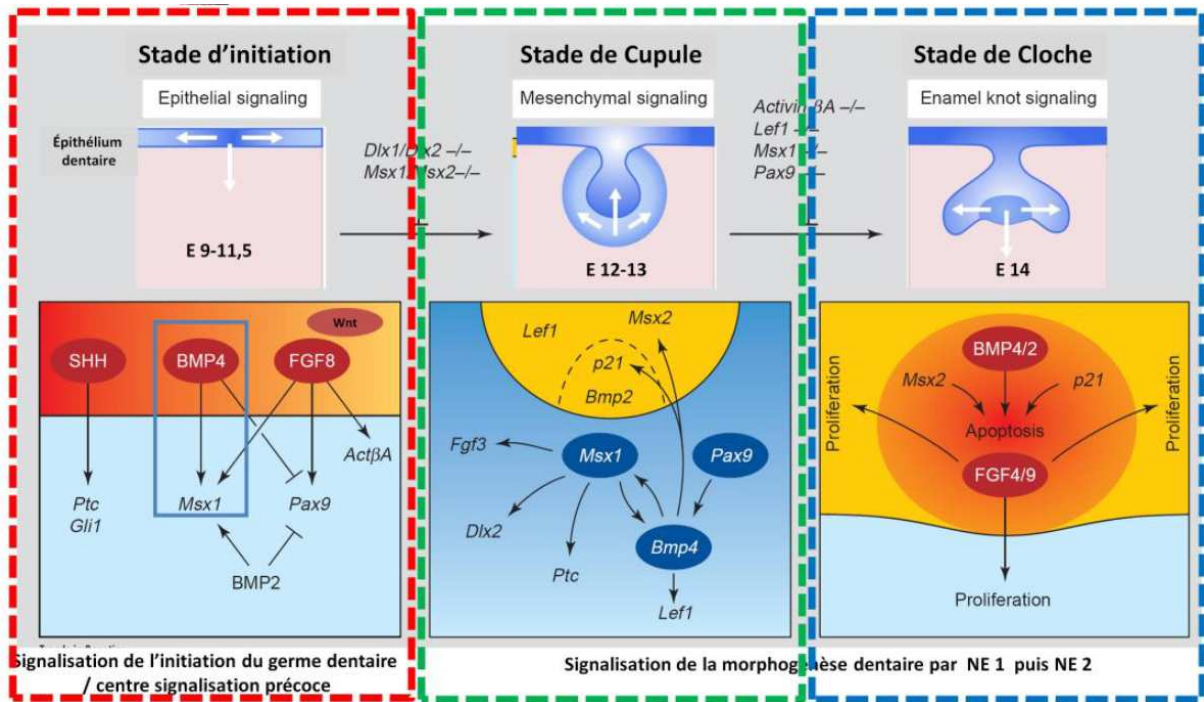


Notion de centre de signalisation

Ces nœuds de l'émail sont des centres de signalisation. Par définition, un centre de signalisation est une structure cellulaire transitoire responsable de la synthèse de facteurs de transcription et de molécules de signalisation qui vont déterminer localement l'activité cellulaire d'un territoire tissulaire.

Au cours de la formation dentaire, on a successivement 3 types de centres de formations (= centres de signalisation) :

- Un **centre de signalisation précoce** (au moment où l'on a la formation de la placode) au stade d'initialisation donc au 11^{ème} jour
- On a un centre de signalisation qui est appelé le **nœud de l'émail primaire** entre le 13^{ème} et le 14^{ème} jour du développement embryonnaire de la souris
- Plus tard après la disparition du nœud de l'émail primaire, on a l'apparition du **nœud de l'émail secondaire** vers le 15^{ème}/ 16^{ème} jour du développement embryonnaire.



Au stade d'initiation, le 1^{er} centre de signalisation appelé le **centre de signalisation précoce**, va permettre le bourgeonnement épithélial responsable de la formation de la placode dentaire. A ce stade on a un signal épithélial (cf. avant) qui va entraîner une activité dans l'ectomésenchyme. **Le signal épithélial correspond à la sécrétion de BMP4** qui va entraîner au niveau de l'ectomésenchyme l'expression du **gène MSX1**. **MSX1 est également activé par la BMP2 du tissu mésenchymateux.**

Le 2nd centre de signalisation, le **nœud de l'émail primaire**, correspond au niveau morphologique au stade de la cupule dentaire. Il apparaît à la fin de l'évolution du bourgeon, à la partie apicale du bourgeon et reste actif de 24 à 36h jusqu'à ce que débute le stade de la cupule. **L'apparition de ce centre de signalisation est sous la dépendance de la BMP4 ectomésenchymateuse.**

Rq : On a vu avec les expériences d'association réassociation qu'à certains moments que c'était le mésenchyme qui avait les molécules capables d'induire le développement dentaire, donc cette molécule **c'est principalement la BMP4 qui a été activée par le gène MSX1 situé également au niveau du mésenchyme**. L'activité de BMP4 va entraîner l'expression dans l'épithélium de certains gènes ou certains facteurs de croissance comme MSX2, BMP2 et P21. P21 et BMP2 dans l'épithélium sont des **molécules pro-apoptotiques** donc c'est l'apparition de ces molécules qui va entraîner la disparition de ce nœud de l'émail primaire.

Après les nœuds de l'émail primaires vont apparaître des **nœuds de l'émail secondaires** qui vont correspondre aux futures cuspides de la dent (cf. diapo précédente). On voit déjà sur ce schéma à ce stade là que les molécules qui vont entraîner des variations morphologiques sont produites au niveau de l'épithélium : **ce sont les BMP4 et 2 qui entraînent l'apoptose et les FGF 4 et 9 qui vont entraîner eux une prolifération dans le mésenchyme (ou ectomésenchyme) et dans l'épithélium.**

Des préparations d'hybridation in situ qui correspondent au nœud de l'émail primaire

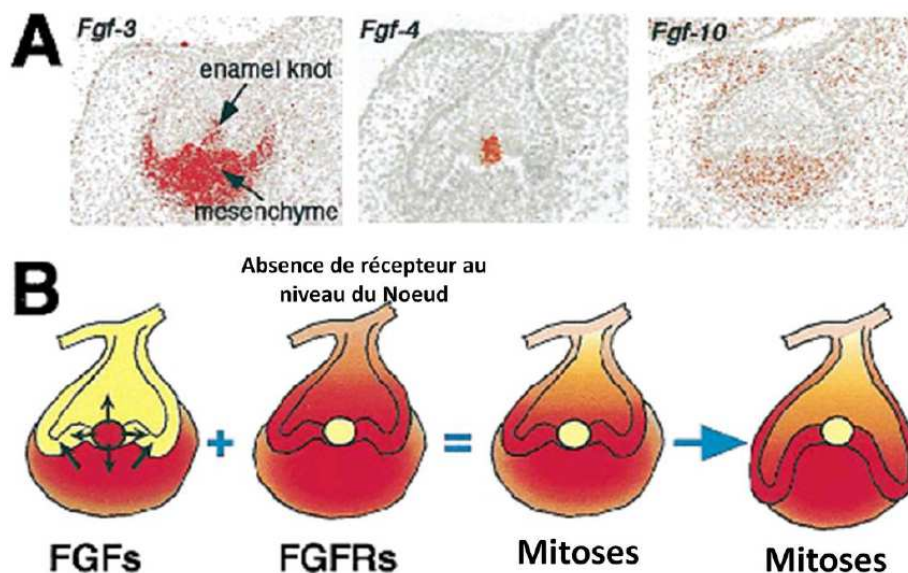
Le nœud de l'émail primaire se situe dans la partie épithéliale au centre de la cupule (dessiné sous forme de sphère rouge en bas à gauche). Ce sont des expériences d'hybridation où on a marqué certains facteurs de croissances en particulier les **Fgf -3, Fgf -4 et Fgf-10** (fibroblast growth factors).

C'est au niveau du nœud de l'émail que sont produits les Fgf 3 et 4 : la fgf 4 est vraiment localisée exactement au niveau du nœud de l'émail primaire (coupe au milieu en haut de la diapo). Le fgf 3 est synthétisé au niveau du nœud de l'émail mais également dans l'ectomésenchyme sous-jacent (coupe en haut à gauche).

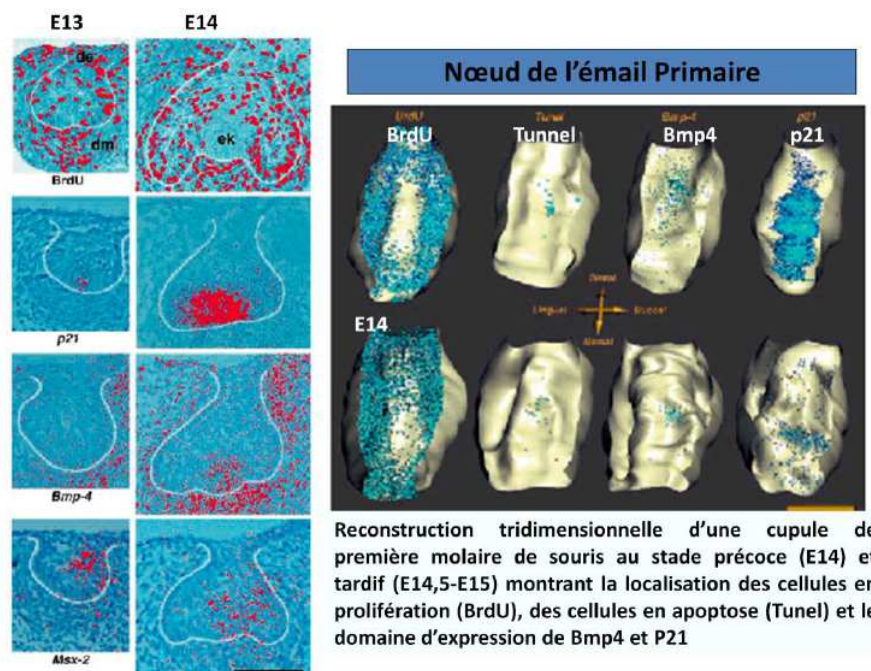
Rq : bien qu'on ait une sécrétion de Fgf 3 abondamment dans tout le tissu qui entoure le nœud de l'émail on n'observe pas une prolifération au niveau de ce nœud de l'émail. Ceci est dû au fait que **les cellules du nœud de l'émail n'expriment pas de récepteurs aux Fgf donc elles ne réagissent pas à cet afflux de facteurs de croissances.**

Le résultat va donc être une activité de prolifération cellulaire très importante **autour** du nœud de l'émail qui va entraîner le **passage du stade cupule au stade de cloche** et qui va donc permettre à l'organe dentaire embryonnaire de se développer.

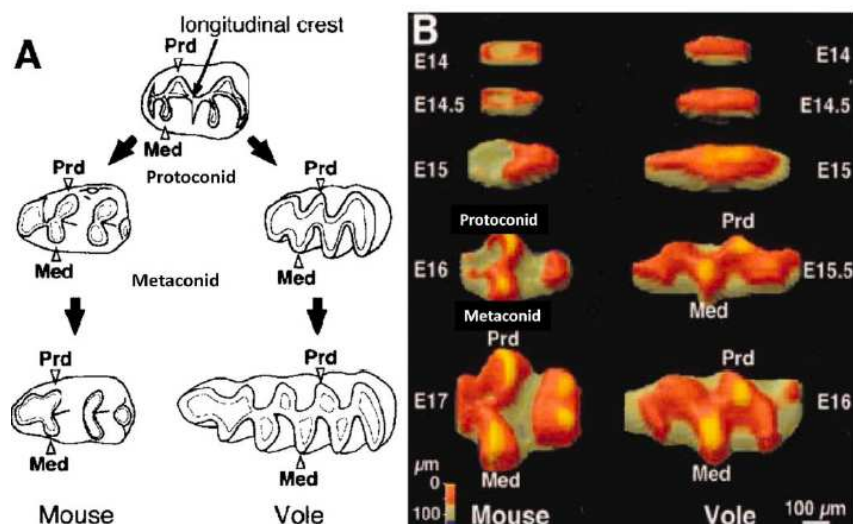
Associée à cette absence de récepteurs aux Fgf, on a également une sécrétion au niveau du nœud de l'émail de facteurs pro-apoptotiques p21, EF1, BMP4 et BMP2. **Sous l'effet de ces 2 mécanismes on contrôle très exactement la durée de vie de ce nœud de l'émail à 24/36h chez la souris.**



On voit à gauche des coupes histologiques faites à travers les cupules d'une première molaire de souris au stade 13 jours et 14 jours. Le marquage BrdU permet de voir la prolifération. On voit ainsi qu'au 13^{ème} jour on a une prolifération autour de l'organe de l'émail, la prolifération qui se continue au 14^{ème} jour mais on voit une limite très nette entre le nœud de l'émail et les tissus qui l'entourent. On voit à droite des reconstitutions 3D de coupes faites tout le long de la dent. On voit les territoires de la dent et le marquage BrdU (premières reconstitutions à gauche) : au niveau du centre de la future cuspide on voit bien qu'on n'a pas de prolifération cellulaire. On prend ensuite tout à droite le facteur P21 (pro apoptotique) où on voit qu'il est exprimé de manière très importante au 14^{ème} jour au niveau du centre de la future cuspide. Une fois que le nœud de l'émail a disparu son expression est beaucoup plus faible.



Des dents un peu plus complexes avec des nœuds de l'émail secondaires. On voit par hybridation in situ, cad la même méthode que précédemment, une reconstitution 3D (à droite) avec en fonction des jours l'expression des facteurs qui contrôlent l'apparition du nœud de l'émail (ici p21). On voit que l'expression p21 correspond exactement dans le développement de la dent où on aura les cuspides, **donc on aura une relation directe entre les nœuds de l'émail secondaires et la forme de la dent.**



Chez l'Homme cela est très complexe (car on a 3 molaires et des dents de lait) alors que chez la souris c'est un mécanisme relativement simple (car on a un seul type de dent c'est-à-dire l'incisive à croissance continue et une seule molaire). Tout ce qui a été dit précédemment c'était pour la souris du jour 9/10 jusqu'au stade de la cloche tardive au 16^{ème} jour, au moment de l'éruption. Chez l'Homme on va débiter à la 5^{ème} semaine du développement embryonnaire pour arriver à la 18^{ème} semaine du développement avec le début de la formation de l'émail, de la dentine...

On retrouve chez l'Homme les mêmes facteurs de croissance dans l'épithélium et dans l'ectomésenchyme avec quelques petites différences. Chez l'Homme la différence c'est qu'on connaît surtout le rôle des facteurs de croissance par les pathologies **qui sont associées à leur disparition**.
Ex : pathologie avec disparition de MSX1 avec altération spécifique de forme, de structure et de nombre de dents plus tard.