ÉTUDE HISTOLOGIQUE DES MINÉRALISATIONS ECTOPIQUES GINGIVALES DANS LE SYNDROME ÉMAIL REIN

HISTOLOGICAL STUDY OF GINGIVAL ECTOPIC MINERALIZATIONS IN ENAMEL RENAL SYNDROME (ERS)

DIARRA A[12], DIALLO AM[3], GUIRASSY ML[3], OUÉDRAOGO RA[14], BATIONO R[5], MILLOGO M[12]

1- Unité de Formation et de Recherche en Sciences de la Santé (UFR/SDS), Université Ouaga I Pr Joseph Ki-Zerbo.

2- Centre Hospitalier Universitaire de Tengandogo, 11BP :104 Ouagadougou CMS 11, Burkina Faso.

3- Service de Parodontologie, Département d'odontologie, Faculté de Médecine, Pharmacie et d'Odontologie, Université Cheikh Anta Diop, Dakar, Sénégal.

4- Service d'Histo-embryologie-cytogénétique et Biologie de la reproduction Centre Hosptialier Universitaire de Bogodogo.

5- Centre Médical, Camp Général Aboubacar Sangoulé Lamizana, Ouagadougou, Burkina Faso.

Correspondance : Dr Abdoulaziz DIARRA

Unité de Formation et de Recherche en Sciences de la Santé (UFR/SDS), Section Dentaire

Université Ouaga I Pr Joseph Ki Zerbo 03 BP 7021 Ouagadougou 03, Burkina Faso.

E-mail: abdoulaziz483@yahoo.fr / Tél: +22674015901

RÉSUMÉ

Introduction : Le Syndrome Email-Rein (ERS; OMIM #204690) est une maladie génétique rare résultant d'une mutation homozygote du gène FAM20A. Il est caractérisé par une amélogénèse imparfaite hypoplasique, des inclusions dentaires, une gencive hyperplasique présentant des calcifications ectopiques associées de façon inconstante à une néphrocalcinose.

Objectif : L'objectif de ce travail était d'identifier et caractériser les calcifications ectopiques des tissus mous parodontaux rencontrées dans l'ERS et de comparer leurs aspects à ceux d'un tissu sain.

Patients et méthode : Des échantillons biologiques ont été collectés après intervention chirurgicale sur deux patients, (dont l'un atteint de l'ERS) dans le cadre de leur prise en charge bucco-dentaire. Ces échantillons ont ensuite été soumis à une série de colorations histologiques et une analyse par spectroscopie infrarouge pour mettre en évidence des minéralisations ectopiques gingivales et leurs caractéristiques.

Résultats : Les analyses histologiques ont révélé la présence de nodules de minéralisation ectopiques disposés en amas dans l'ensemble du tissu conjonctif gingival; ainsi qu'une diminution des fibres élastiques et des faisceaux de collagène dans la gencive du patient malade comparativement à celle du patient témoin.

L'exploration de la fonction sulfate a révélé une quantité plus importante de protéoglycanes sulfatés dans la gencive du patient malade.

Conclusion : Dans cette étude, il a été mis en évidence les minéralisations ectopiques pouvant apparaître dans les tissus mous dentaires et péridentaires lors de l'ERS et leurs caractéristiques ont été déterminées. Des investigations plus approfondies sont nécessaires pour comprendre les mécanismes patho-génétiques de cette pathologie très handicapante au niveau bucco-dentaire.

Mots cles : mutation fam20a, ers, mineralisation ectopique, histologie.

ABSTRACT

Introduction: *The Enamel-Renal Syndrome (ERS; OMIM #204690) is rare genetic disease resulting of a homozygote mutation of the FAM20A gene. It is characterized by hypoplasic amelogenosis imperfecta, dental inclusions, hyperplasic gum with ectopic calcifications associated sometimes with a nephrocalcinosis:*

Objective: *The purpose of this work was to identify and characterize the ectopic calcifications of periodontal soft tissues encountered in the ERS and to compare their aspects with those of a healthy tissue.*

Patients and methods: *Biological samples were collected after surgery on two patients (one with ERS) as part of their oral management. These samples were then subjected to histological colorations and infrared spectroscopy analysis to highlight gingival ectopic mineralizations and their characteristics.*

Results: *Histological analyses revealed the presence of ectopic mineralization nodules arranged in clusters throughout the gum connective tissue; as well as a decrease in elastic fibers and collagen bundles in the gums of the sick patient compared to that of the healthy patient.*

Exploration of sulphate function revealed a greater amount of sulphate proteoglycans in the ERS patient's gum.

Conclusion: *In this study, the ectopic mineralizations that could appear in the soft dental and periodontal tissues at the ERS were identified and their characteristics were determined. Further investigations are needed to understand the patho-genetic mechanisms of this highly disabling oral pathology.*

***Keywords:* fam20a mutation, ers, ectopic mineralization, histology.**

© EDUCI 2020

INTRODUCTION

Syndrome récessif, caractérisé par une sévère hypoplasie de l'émail, des inclusions dentaires, une gencive hyperplasique avec des calcifications ectopiques associées de façon inconstante à une néphrocalcinose, le Syndrome Email-Rein (ERS; OMIM #204690) est une maladie génétique rare qui résulte d'une mutation homozygote du gène FAM20A (family with sequence similarity 20, member A) [1]. Découverte il y a une trentaine d'années [2,3], la famille FAM20 comporte trois membres présentant une grande similarité de séquence : FAM20A, B et C. Selon certains auteurs, FAM20A est une pseudo kinase qui forme un complexe fonctionnel avec FAM20C; et ce complexe extracellulaire augmente la phosphorylation des protéines en voie de sécrétion [4]. La protéine codée par FAM20A serait exprimée dans les améloblastes au cours des stades de sécrétion et de maturation de l'émail, dans les cellules suprabasales gingivales, les odontoblastes et les cellules pulpaires dentaires, indiquant son rôle fondamental dans le développement de l'émail et l'homéostasie gingivale [5]. Par conséquent, les mutations de ces gènes semblent se traduire par une dérégulation du microenvironnement cellulaire en phosphate et en calcium et donc une perturbation des processus de minéralisation aboutissant à l'apparition de calcifications ectopiques [6].

L'objectif de ce travail était d'identifier et caractériser les calcifications ectopiques des tissus mous dentaires et parodontaux rencontrées dans l'ERS et de comparer leurs aspects à ceux d'un tissu sain.

2. PATIENTS ET MÉTHODES

Des échantillons biologiques ont été collectés après une intervention chirurgicale sur deux patients dans le cadre de leur prise en charge bucco-dentaire et génétique.

Le patient 1, âgé de 22 ans et originaire d'Afrique subsaharienne, s'est présenté en consultation au Service d'Odontologie de l'Hôpital La Pitié Salpetrière de Paris en vue de réhabilitation prothétique. Le patient 2, patient contrôle, en bon état de santé, d'origine maghrébine, avait 25 ans et s'était présenté pour des avulsions de dents de sagesses enclavées. Les patients ont déclaré ne pas avoir ingéré de médicaments pouvant modifier l'homéostasie gingivale et ont signé un consentement éclairé préalablement soumis au comité d'éthique de l'hôpital.

2.1 PRÉPARATION DES PRÉLÈVEMENTS

Les prélèvements de gencive destinés aux colorations histologiques ont été rincés avec une solution saline de PBS (Invitrogen, Carlsbad, CA), fixés avec du paraformaldéhyde (PFA) tamponné à 4% (Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA) pendant 48 heures et ont été ensuite déshydratés dans des bains croissants d'éthanol, puis inclus en paraffine. A partir des blocs de paraffine, des coupes fines de 7 microns ont été réalisées et étalées sur lame.

2.2 COLORATIONS EFFECTUÉES

Plusieurs colorations classiques et spécifiques ont été réalisées pour mettre en évidence les constituants et les différences tissulaires entre les deux types d'échantillons selon les protocoles établis par la Bristol veterinary school.

Coloration à l'hématoxyline-éosine

L'hématoxyline de Mayer colore les noyaux cellulaires en bleu violet, tandis que l'éosine colore le cytoplasme et la matrice extracellulaire en rose. Il s'agit d'une coloration classique standard. Après fixation et déshydratation dans des bains de clearène puis dans des bains d'éthanol absolu, les coupes sont réhydratées, colorées à l'hématoxyline de Mayer pendant 1 minute. Après rinçage à l'eau distillée, une différenciation alcool-acide est réalisée en quelques secondes, puis s'en suit la coloration à l'éosine pendant 30 secondes. Les coupes sont déshydratées à nouveau, rincées au clearène puis montées entre lame et lamelle avec un milieu de montage en résine DPX.

Coloration au rouge alizarine

La coloration au rouge alizarine permet de détecter la minéralisation des tissus ou de culture cellulaire. Le colorant va se fixer aux dépôts de calcium par un processus de chélation. La coloration se sature en rouge proportionnellement à la minéralisation ; une fois les étapes de fixation, déshydratation et réhydratation effectuées, les coupes sont colorées avec une solution de rouge alizarine pendant 2 à 5 minutes. Elles sont ensuite déshydratées dans des bains successifs d'acétone, d'éthanol et de clearène avant d'être montées entre lame et lamelle.

Coloration au trichrome de Goldner

Cette technique associe une coloration nucléaire et une coloration élective du collagène. Elle peut être utilisée pour les tissus conjonctifs, mais aussi pour

mettre en évidence de la matrice ostéoïde dans le tissu osseux. Après coloration des noyaux à l'hématoxyline de Mayer (20 minutes) puis différenciation alcool-acide, trois solutions de colorant ont été employées à cet effet. Il s'agit respectivement de la solution fushine-ponceau (5minutes), de la solution orange G + acide phosphomolybdique (3minutes) et du vert lumière (5minutes).

Coloration Von Kossa

Cette technique permet de mettre en évidence des dépôts de calcium ou des sels de calcium ; les coupes sont traitées avec une solution de nitrate d'argent 2% pendant 1 heure 30 minutes où l'argent se substitue progressivement au calcium, suite à une exposition prolongée à une lumière forte. Une contre coloration au rouge nucléaire a été réalisée pendant (1 minute), puis les coupes ont été montées entre lame et lamelle avec le milieu DPX.

Coloration au bleu alcian

Le bleu alcian permet de colorer les protéoglycanes de la matrice en bleu ciel; à pH 2,5 il colore tous les protéoglycanes, tandis qu'à pH 1, seuls les protéoglycanes sulfatés sont mis en évidence. Après les étapes de fixation, déshydratation puis réhydratation, les coupes sont colorées au bleu alcian pendant 30 minutes ; des séances de rinçage à l'eau courante puis à l'eau distillée sont ensuite effectuées. Les étapes de montage en milieu résine sont réalisées.

Coloration au rouge Sirius

Cette coloration permet de visualiser les fibres de collagène de la matrice extracellulaire en rouge ; une première coloration à l'hématoxyline a été faite pour mettre en évidence les noyaux (5minutes) puis les coupes ont été colorées avec une solution de Rouge picrosirius pendant 15 minutes, avant d'être montées entre lame et lamelle en milieu résine.

Coloration à l'orcéine

Cette coloration permet de visualiser les fibres élastiques dans les tissus. Les coupes sont colorées à l'orcéine pendant 30 à 60 minutes, puis contre-colorées au rouge nucléaire pendant 5 minutes et le montage est effectué en milieu résine.

2.3 ANALYSE AU FTIR (FOURRIER TRANSFORM INFRA RED SPECTROSCOPY)

Des coupes de 3 microns ont été déposées sur des lames de microscope à faible émissivité (mirror, Kevley Technologies, Sciences Tienta, Indianapolis). Ces coupes ont ensuite été déparaffinées chimiquement afin d'améliorer la détection de cristaux au microscope.

Les cartes de microspectroscopie infrarouge ont été recueillies en mode de réflexion en utilisant un microscope à infrarouge couplé à un spectromètre FTIR (Spotlight 400 FTIR Système Microscope, PerkinElmer, Villebon -sur- Yvette, France). Les analyses et cartes présentées ici ont été atteintes avec une surface projetée sur l'échantillon de 6,25 x 6,25 µm et une taille de pas de 8 µm et chaque spectre a été acquis après 2 accumulations à 8 cm^{-1} de résolution spectrale.

3. RÉSULTATS

3.1. MISE EN ÉVIDENCE DES MINÉRALISATIONS ECTOPIQUES DANS LA GENCIVE

Les analyses histologiques révèlent la présence de nodules disposés en amas dans l'ensemble du tissu conjonctif du patient malade (figure 1 A, A' et A"). Ces structures arrondies acides sont vraisemblablement composées de phosphate de calcium, comme le suggèrent les colorations au rouge Alizarine (coloration du calcium libre : figure 1 B, B' et B") et au Von Kossa (coloration de phosphates ou carbonates ; (figure 1 C, C'et C"). Le trichrome de Goldner révèle que ces nodules sont plus minéralisés à l'intérieur qu'en périphérie (figure 1 D, D'et D").

3.2. COMPARAISON DES COMPOSANTS MATRICIELS DANS LA GENCIVE

La comparaison d'éléments matriciels (macromolécules de la MEC) du tissu conjonctif gingival entre le patient 1 (malade) et le patient 2 (contrôle) révèle une diminution des faisceaux de collagène et des fibres élastiques chez le patient malade par rapport au patient contrôle. On note également un enrichissement de la MEC du tissu conjonctif gingival en glycosaminoglycanes (GAGs) chez le patient malade (figure 2).

3.3. CARACTÉRISTIQUES CHIMIQUES DES MINÉRALISATIONS ECTOPIQUES DUES À FAM20A

La fonction sulfate caractéristique des GAGs a été évaluée dans la coupe de gencive du patient malade et comparée à celle du patient contrôle. Le bleu alcian pH1 spécifique aux protéoglycanes (PG) sulfatés révèle que la MEC du tissu conjonctif gingival du patient malade est plus riche en PG sulfatés que celle du patient contrôle (figure 3 A et B). Cela est

 © EDUCI 2020

confirmé par les images du FTIR sur lesquelles on constate une différence d'intensité notable entre les coupes de gencive du patient malade par rapport au patient contrôle avec des zones d'absorption plus intenses de la fonction sulfate, se situant aux mêmes localisations que les calcifications (figure 3 C et D).

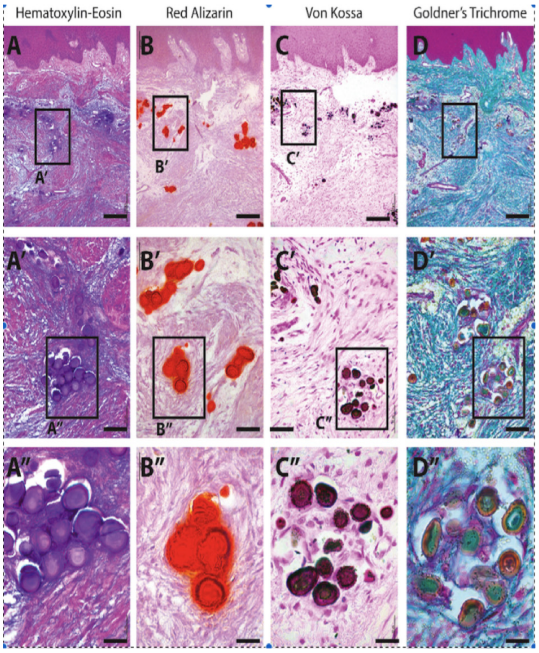

Figure 1 : Analyse histologique des coupes gingivales sériées du patient malade.

Coloration Hématoxyline-Eosine (A, A', A''); coloration rouge alizarine (B, B', B'') ; coloration von kossa (C, C', C''); Coloration trichrome de Goldner (D, D', D'').

Echelle barre noire de 20 µm: A B C D ; échelle barre noire de 50 µm: A' B' C' D'; échelle barre noire de 200 µm: A'' B'' C'' D''.

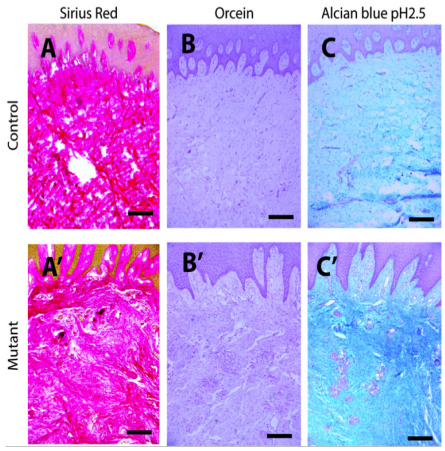

Figure 2: Caractérisation histologique des macromolécules de la MEC du tissu conjonctif gingival.

Coloration rouge sirius (A, A') ; coloration orceine (B, B') ; coloration bleu alcian pH 2,5 (C, C') mettant en évidence les GAGs dans le tissu conjonctif gingival : on note une densité plus importante des colorations chez le patient malade par rapport au témoin (échelle barre noire de 200 µm).

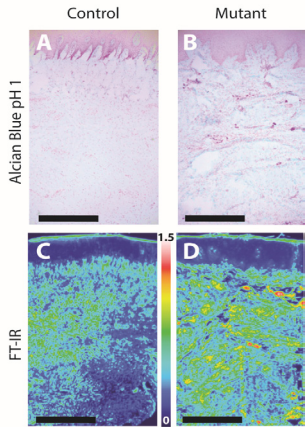

Figure 3 : Caractérisation des sulfates dans la gencive.

A) Coloration au bleu alcian pH 1 de la coupe de gencive de patient témoin comparée à celle du patient malade (B) (échelle barre noire de 200 um).

C) carte chimique de la fonction sulfate (1240 cm-1) de la coupe de gencive de patient contrôle.

D) carte chimique de la fonction sulfate (1240 cm-1) de la coupe de gencive de patient malade.

4. DISCUSSION

Cette étude a mis en évidence la présence de calcifications ectopiques dans le revêtement gingival des patients atteints du syndrome ERS. Une combinaison des analyses cliniques, radiologiques et génétiques a permis de poser le diagnostic de l'ERS selon les signes pathognomoniques précédemment décrits par De La Dure Molla et *al.* [7].

La minéralisation du tissu conjonctif gingival est rare et pathologique. Récemment, Durado et *al*, en 2018 ont décrit une série de 11 cas d'ERS au Brésil avec un diagnostic génétique établi [8]. Cependant, le processus de minéralisation n'avait pas été caractérisé dans leur étude. Nos résultats ont montré que ces minéralisations ectopiques sont des nodules de phosphate de calcium organisés en structure cristalline (colorations von kossa et rouge alizarine). L'apparition de ces nodules serait due à une modification des composantes matricielles, se manifestant par un appauvrissement du réseau fibrillaire (élastine et collagène) et un enrichissement en glycosaminoglycanes (coloration rouge sirius, orcéine et bleu alcian).

La plupart des études précédentes ont rapporté des mutations homozygotes dans tous les 11 exons et quelques introns de la protéine FAM20A, se traduisant par un troncage de protéine (codon stop prématuré par exemple) [9-11]. Dans le cas du patient de cette étude, une mutation par substitution d'un nucléotide Thymine par Cytosine a été effectivement observée.

La minéralisation des tissus conjonctifs est un processus actif qui fait suite à des changements métaboliques locaux, dépendant à la fois des facteurs génétiques et environnementaux. Ces changements contribuent à modifier l'équilibre entre les voies activatrices et inhibitrices des mécanismes de minéralisation [12]. Dans les maladies acquises, les mécanismes de minéralisation résultent de la conjonction de plusieurs facteurs qui rendent l'identification du processus pathologique extrêmement difficile [13]. En revanche, les pathologies congénitales s'accompagnant de modèles animaux ont permis de déterminer des facteurs pro/anti minéralisants dans les tissus conjonctifs. Aujourd'hui, les mécanismes pathogénétiques permettant d'inhiber la survenue de ces minéralisations ectopiques restent à découvrir. Des études supplémentaires sont nécessaires pour appréhender ces mécanismes au niveau protéique et moléculaire. Car cette étude comporte cependant certaines limites. En effet, tous nos résultats se rapportent à un seul patient, la maladie étant rare et la procuration d'échantillons biologiques difficile. Les résultats ne peuvent donc pas être généralisés. Le cas particulier du patient 1 est très sévère et ne représente pas forcément tous les phénotypes de mutations de FAM20A.

CONCLUSION

L'implication de FAM20A dans les processus de minéralisation est un fait avéré à l'heure actuelle. Dans cette étude il a été mis en évidence les minéralisations ectopiques pouvant apparaître dans les tissus mous via l'exemple du revêtement gingival lors de l'ERS et leurs caractéristiques ont été déterminées. Malgré sa faible prévalence, des investigations plus approfondies sont nécessaires pour comprendre les mécanismes pathogénétiques de l'ERS. Cette pathologie peut être très handicapante et la réhabilitation prothétique des patients est souvent très complexe, quoique nécessaire pour améliorer leur qualité de vie.

RÉFÉRENCES

1. DIARRA A, DIALLO AM, FALL M, BATIONO R, MILLOGO M, KABORÉ WAD Syndrome Email-Rein : à propos d'un cas. *Rev Col Odonto-Stomatol Afr Chir Maxillo-fac,* Juin 2020, 27 (2): 21-25.
2. NALBANT D, YOUN H, NALBANT SI, SHARMA S, COBOS E, BEALE EG, ET AL. FAM20: an evolutionarily conserved family of secreted proteins expressed in hematopoietic cells. *BMC Genomics.* 2005;6:11. doi:10.1186/1471-2164-6-11.
3. ZHANG H, ZHU Q, CUI J, WANG Y, CHEN MJ, GUO X, TAGLIABRACCI TS, DIXON JE, XIAO J. Structure and evolution of the Fam20 kinases *NATURE COMMUNICATIONS* 2018; 9:1218.
4. CUI J, XIAO J, TAGLIABRACCI VS, WEN J, RAHDAR M, DIXON JE. A secretory kinase complex regulates extracellular protein phosphorylation. *Elife* 4:e06120. doi:10.7554/*elife*.06120
5. O'SULLIVAN J, BITU CC, DALY SB, URQUHART JE, BARRON MJ, BHASKAR SS ET AL. Whole-Exome sequencing identifies FAM20A mutations as a cause of amelogenesis imperfecta and gingival hyperplasia syndrome. *Am J Hum Genet.* 2011;88(5):616-20.
6. LIGNON G, BERES F, QUENTRIC M, ROUZIÈRE S, WEIL R, DE LA DURE-MOLLA M ET AL. FAM20A gene mutation: amelogenesis or ectopic mineralization? Front.*Physiol.* 2017;8,267.
7. DE LA DURE-MOLLA M, QUENTRIC M, YAMAGUTI PM, ACEVEDO AC, MIGHELL AJ, VIKKULA M, et al. Pathognomonic oral profile of Enamel Renal Syndrome (ERS) caused by recessive FAM20A mutations. *Orphanet J Rare Dis.* 2014;9:84. doi: 10.1186/1750-1172-9-84
8. DOURADO MR, DOS SANTOS CR, DUMITRIU S, IANCU D, ALBANYAN S, KLETA R, COLETTA RD, ANA MESQUITA TM. Enamel renal syndrome A novel homozygous FAM20A founder mutation in 5 new brazilian families. *Eur. J. Med. Genet.* 2019 Nov; 62 (11): 103561.
9. JAUREGUIBERRY G, DE LA DURE-MOLLA M, PARRY D, QUENTRIC M, HIMMERKUS N, KOIKE T ET AL. Nephrocalcinosis (enamel renal syndrome) caused by autosomal recessive FAM20A mutations. *Nephron Physiol.* 2012;122(1-2):1-6.
10. KANTAPUTRA PN, KAEWGAHYA M, KHEMALEELAKUL U, DEJKHAMRON P, SUTTHIMETHAKORN S, THONGBOONKERD V ET AL. Enamel-renal-gingival syndrome and FAM20A mutations. *Am J Med Genet A.* 2014;164A(1):1-9.
11. WANG S-K AP, HU Y, MILKOVICH RN, SIMMER JP. FAM20A Mutations Can Cause *Enamel-Renal Syndrome (ERS). PLOS Genetics.* 2013;9(2):e1003302.
12. RONCHETTI I, BORALDI F, ANNOVI G, CIANCIULLI P, QUAGLINO D. Fibroblast involvement in soft connective tissue calcification. *Front Genet.* 2013;4:22. doi: 10.3389/fgene.2013.00022
13. MURSHED M, MCKEE MD. Molecular determinants of extracellular matrix mineralization in bone and blood vessels. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 2010;19(4):359-65.

 © EDUCI 2020