



**HAL**  
open science

# Analyse phénotypique comparative des cellules dentaires et osseuses

Dominique Hotton

► **To cite this version:**

Dominique Hotton. Analyse phénotypique comparative des cellules dentaires et osseuses. Physiologie [q-bio.TO]. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2011. Français. NNT : 2011PA066149 . tel-00824884

**HAL Id: tel-00824884**

**<https://theses.hal.science/tel-00824884>**

Submitted on 22 May 2013

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

**THESE DE DOCTORAT DE  
L'UNIVERSITE PIERRE ET MARIE CURIE**

Spécialité

**PHYSIOLOGIE ET PHYSIOPATHOLOGIE**

Présentée par

**Monsieur HOTTON Dominique**

Pour obtenir le grade de

**DOCTEUR de l'UNIVERSITÉ PIERRE ET MARIE CURIE**

Sujet de la thèse

**“Analyse phénotypique comparative des cellules dentaires et osseuses”**

soutenue le 15 juin 2011

devant le jury composé de

**Mr. le Professeur Jean-Marie DUPRET  
Mr. le Docteur El-Hassan SHABANA  
Mr. le Professeur Henry MAGLOIRE  
Mr. le Professeur Jean-Luc DAVIDEAU  
Mme le Professeur Ariane BERDAL  
Mr. le Professeur Jean-François BERNAUDIN**

**Président  
Directeur de thèse  
Rapporteur  
Rapporteur  
Examineur  
Examineur**

## REMERCIEMENTS

**Madame le Professeur Ariane BERDAL,**

*Je tiens à profiter de l'opportunité qui m'est offerte pour exprimer ma joie quotidienne de travailler dans votre équipe et de participer à la construction de ce laboratoire depuis un quart de siècle.*

*Ma vie professionnelle est enrichie de votre passion pour la recherche.*

*Je vous suis également reconnaissant pour votre patience, votre attention, vos encouragements dans toutes les étapes de cette thèse.*

*Enfin, recevez le témoignage de ma gratitude, de mon estime, de ma considération et de mon amitié sincère et fidèle.*

**Monsieur le Docteur El-Hassan SHABANA,**

*Je tiens à vous remercier d'avoir accepté de diriger cette thèse, avec rigueur, patience et en faisant preuve d'une grande pédagogie. Veuillez trouver ici l'expression de ma sincère reconnaissance.*

**Monsieur le Professeur Jean-Marie DUPRET,**

*Je vous remercie vivement d'avoir accepté d'être le Président du jury de cette thèse. Veuillez trouver ici, l'expression de ma reconnaissance la plus sincère.*

**Monsieur le Professeur Jean-François BERNAUDIN,**

*Je vous remercie de m'avoir fait l'honneur d'évaluer ce travail en tant qu'examineur et également pour l'initiation à l'hybridation in situ que vous avez bien voulu me prodiguer au siècle dernier.*

**Monsieur le Professeur Henry MAGLOIRE,**

*Je vous remercie pour l'honneur que vous me faites d'accepter de juger ce travail. Veuillez trouver ici, l'expression de ma profonde admiration et de ma sincère reconnaissance.*

**Monsieur le Professeur Jean-Luc DAVIDEAU,**

*Je vous remercie pour l'honneur que vous me faites en acceptant de juger ce travail. Recevez également le témoignage de ma profonde gratitude et de ma sincère reconnaissance.*

*Je tiens à remercier tout particulièrement les membres, sans exception, du laboratoire "Physiopathologie Orale Moléculaire", UMRS 872 - Equipe 5, pour leur aide précieuse, leur gentillesse et leur soutien.*

# **TABLE DES MATIERES**

## **I. INTRODUCTION : LA BIOMINERALISATION**

## **II. ANATOMIE MACROSCOPIQUE ET MICROSCOPIQUE**

### **II.A. Le squelette humain**

### **II.B. Le squelette cranio-facial et dento-alvéolaire**

#### **II.B.1. Dentures et dentition**

II.B.1.a. L'émail

II.B.1.b. La dentine

II.B.1.c. La pulpe dentaire

II.B.1.d. Le ciment

#### **II.C.1. Origine et formation du squelette**

II.C.1.a. Origine embryologique du squelette

II.C.1.b. Morphogenèse maxillo-faciale

## **III. LES TISSUS MINERALISES : ASPECTS CELLULAIRES**

### **III.A. Le tissu osseux**

#### **III.A.1. Les cellules osseuses**

III.A.1.a. Les préostéoblastes

III.A.1.b. Les ostéoblastes

III.A.1.c. La différenciation ostéoblastique

III.A.1.d. La matrice extracellulaire osseuse (MEC)

III.A.1.e. La minéralisation de la matrice extracellulaire

III.A.1.f. Les ostéocytes

III.A.1.g. Modelage, remodelage et ostéoclastes

#### **III.A.2. Processus d'ossification et particularités des os craniaux-faciaux**

III.A.2.a. La morphogénèse du squelette cranio-facial

#### **III.A.3. Le développement dentaire**

III.A.3.a. Etapes embryonnaires du développement dentaire

III.A.3.a.1. La morphogenèse précoce

III.A.3.a.2. Initiation du développement dentaire

III.A.3.a.3. Les différents stades anté-nataux

III.A.3.a.4. Histogénèse et minéralisation

III.A.3.b. L'amélogénèse

III.A.3.b.1. La présécrétion

III.A.3.b.2. La sécrétion

III.A.3.b.3. La transition

III.A.3.b.4. La maturation

III.A.3.c. La dentinogénèse

III.A.3.c.1. La présécrétion

III.A.3.c.2. La sécrétion

## **IV. LES PROTEINES DE LA MATRICE EXTRACELLULAIRE**

### **IV.A. Rôles des protéines de la matrice extracellulaire dans la biominéralisation**

**IV.A.1.** Les collagènes

**IV.A.2.** Les protéoglycanes

**IV.A.3.** Les protéines à groupements gamma carboxy-glutamiques ou Gla-protéines

**IV.A.4.** SPARC et SPARCL1

**IV.A.5.** La famille des SCPP

**IV.A.6.** La calbindine-D<sub>28k</sub>

**IV.A.7.** La phosphatase alcaline tissu non spécifique ou TNAP

**IV.A.8.** Les protéines de la matrice amélaire

**IV.A.8.a.** Les Amélogénines

**IV.A.8.b.** L'Améloblastine

**IV.A.8.c.** L'Enaméline

#### IV.A.8.d. Les protéines de la matrice amélaire et la minéralisation dentaire

### V. RESULTATS

#### V.A. Analyse de l'expression des effecteurs de l'odontogénèse

Mise au point des outils d'analyse et application à l'étude de la régulation par une hormone (la vitamine D3) et un facteur de transcription (l'homéoprotéine Msx2)

V.A.1. Article 1

V.A.2. Article 2

V.A.3. Article 3

V.A.4. Article 4

#### V.B. Les protéines amélaïres dans le tissu osseux

V.B.1. Mises au point et évaluations des techniques alternatives pour l'étude *in situ* des tissus minéralisés

V.B.1.a. Adaptation à la grande précision de la PCR en temps réel comparativement aux Northern-blots et à la PCR qualitative

V.B.1.a.1. Protocole des méthodes quantitatives sur broyats de tissus : la PCR en temps réel

V.B.1.a.2. Expressions de l'Amélogénine, de l'Améloblastine et de l'Enaméline

V.B.1.a.3. Profils d'expression des transcrits des trois protéines amélaïres dans les tissus osseux de la mandibule et du tibia

V.B.1.b. Adaptation des techniques d'immunohistochimie à la grande précision de la PCR en temps réel

V.B.1.b.1. Mise au point et évaluation de la technique d'immunohistochimie

V.B.1.b.2. Protocole d'immunohistochimie

V.B.1.b.3. Expression des trois protéines amélaïres dans les tissus osseux de la mandibule et du tibia.

V.B.1.c. Adaptation des techniques d'hybridation *in situ* à la grande précision de la PCR en temps réel

V.B.1.c.1. Mise au point et évaluation de la technique d'hybridation *in situ*

V.B.1.c.2. Protocole d'hybridation *in situ* LNA

V.B.1.c.3. Expression des transcrits de l'amélogénine dans les tissus osseux de la mandibule

### VI. DISCUSSION

VI.A. Schémas établis au cours de l'amélogénèse

VI.B. Le mur de Berlin des protéines de l'émail : des certitudes de la tissu -spécificité à la notion d'ubiquité, un équilibre à établir par des approches quantitatives

### VII. CONCLUSION

### VIII. BIBLIOGRAPHIE

### IX. ANNEXES – LISTE DES PUBLICATIONS DE L'AUTEUR

## TABLE DES ILLUSTRATIONS

### LISTE DES FIGURES

- Figure 1.** Apatites biologiques de différentes tailles en association avec des matrices spécifiques de tissu
- Figure 2.** Le squelette axial et appendiculaire
- Figure 3.** Les 4 types d'os
- Figure 4.** Eléments osseux constitutifs du massif facial
- Figure 5.** La dent et son parodonte
- Figure 6.** L'émail et la dentine chez le rat
- Figure 7.** Les bourgeons faciaux et leur développement
- Figure 8.** Le cloisonnement de la bouche primitive
- Figure 9.** Les différentes voies de différenciation des cellules mésenchymateuses
- Figure 10.** Profil d'expression des différents marqueurs au cours des étapes de la différenciation ostéoblastique
- Figure 11.** Ostéoblastes et ostéocytes
- Figure 12.** Minéralisation osseuse
- Figure 13.** Les ostéoclastes
- Figure 14.** Ossification endochondrale
- Figure 15.** Ossification membraneuse
- Figure 16.** Ossification membranaire et endochondrale du squelette
- Figure 17.** Développement de la dentition humaine (enfant de 6 ans)
- Figure 18.** Le développement dentaire
- Figure 19.** Morphogénèse précoce et morphogénèse tardive
- Figure 20.** L'amélogénèse
- Figure 21.** La dentinogénèse
- Figure 22.** La phylogénie vertébrée et l'évolution de la minéralisation squelettique
- Figure 23.** Les familles des gènes SPARC, SPARCL1 et SCPP au cours de l'évolution
- Figure 24.** Structure du gène de l'amélogénine
- Figure 25.** Les épissages alternatifs de l'amélogénine
- Figure 26.** Expressions de l'amélogénine
- Figure 27.** Notre modèle de l'incisive à croissance continue
- Figure 28.** Schéma des différentes zones de la microdissection des mandibules de souris
- Figure 29.** Expression des transcrits de l'amélogénine
- Figure 30.** Expression des transcrits de l'améloblastine
- Figure 31.** Expression des transcrits de l'énaméline
- Figure 32.** Immunomarquage
- Figure 33.** Immunomarquage de l'amélogénine chez la souris de 7 jours
- Figure 34.** Immunomarquage de l'amélogénine chez la souris de 105 jours
- Figure 35.** Immunomarquage de l'améloblastine chez la souris de 7 jours
- Figure 36.** Immunomarquage de l'améloblastine chez la souris de 105 jours
- Figure 37.** Immunomarquage de l'énaméline chez la souris de 7 jours
- Figure 38.** Les LNA
- Figure 39.** Séquence de la sonde LNA amélogénine
- Figure 40.** Vues générales d'hybridation *in situ* avec des sondes de l'amélogénine sur des coupes frontales d'incisives de souris âgée de 7 jours
- Figure 41.** Agrandissements des zones des coupes frontales d'incisives de souris âgées de 7 jours
- Figure 42.** Hybridation *in situ* avec une sonde LNA de l'amélogénine sur un coupe frontale d'incisive au niveau de la racine
- Figure 43.** Hybridation *in situ* avec une sonde LNA de l'amélogénine sur un coupe frontale d'incisive au niveau de l'os périodonto-alvéolaire
- Figure 44.** Classification des gènes de l'amélogénèse selon leur patron d'expression

## **LISTE DES TABLEAUX**

- Tableau 1.** Les différentes chaînes dans les familles de collagènes
- Tableau 2.** Les protéoglycanes (PG)
- Tableau 3.** La famille des SSCP (Secretory Calcium binding PhosphoProtein)
- Tableau 4.** Primers utilisés
- Tableau 5.** Les anticorps dirigés contre les protéines amélaire
- Tableau 6.** Critères de choix suivant le type de sonde utilisé
- Tableau 7.** Séquence des oligonucléotides LNA



## ABBREVIATIONS

<b>ADN</b>	<b>:</b>	<b>Acide Désoxyribo Nucléique</b>
<b>ADNc</b>	<b>:</b>	<b>Acide Désoxyribo Nucléique complémentaire</b>
<b>AIH</b>	<b>:</b>	<b>Amelogénèse Imparfaite Héritaire</b>
<b>ALP</b>	<b>:</b>	<b>Alkaline Phosphatase</b>
<b>AMB</b>	<b>:</b>	<b>Améloblastine</b>
<b>AMEL</b>	<b>:</b>	<b>Amélogénine</b>
<b>AP2</b>	<b>:</b>	<b>Activing Protein 2</b>
<b>ARN</b>	<b>:</b>	<b>Acide Désoxyribo Nucléique</b>
<b>ARNm</b>	<b>:</b>	<b>ARN messenger</b>
<b>BF</b>	<b>:</b>	<b>Bourgeon Frontal</b>
<b>BGP</b>	<b>:</b>	<b>Bone Gla Protein</b>
<b>BMI</b>	<b>:</b>	<b>Bourgeon Maxillaire Inférieur</b>
<b>BMP</b>	<b>:</b>	<b>Bone Morphogenetic Protein</b>
<b>BMS</b>	<b>:</b>	<b>Bourgeon Maxillaire Supérieur BSP : Bone SialoProtein</b>
<b>BNE</b>	<b>:</b>	<b>Bourgeons Nasaux Externes</b>
<b>BNI</b>	<b>:</b>	<b>Bourgeons Nasaux Internes</b>
<b>CAP</b>	<b>:</b>	<b>Protéine d'Attache du Cément</b>
<b>Dlx</b>	<b>:</b>	<b>Distal Less HomeoboX</b>
<b>DMP1</b>	<b>:</b>	<b>Dentin Matrix Protein 1</b>
<b>DSP</b>	<b>:</b>	<b>Dentin SialoProtein</b>
<b>DSPP</b>	<b>:</b>	<b>Dentin SialoPhosphoProtein</b>
<b>EAI</b>	<b>:</b>	<b>Epithelium Adamantin Interne</b>
<b>EAE</b>	<b>:</b>	<b>Epithélium Adamantin Externe</b>
<b>ED</b>	<b>:</b>	<b>Epithélium Dentaire</b>
<b>ENAM</b>	<b>:</b>	<b>Enaméline</b>
<b>FGF</b>	<b>:</b>	<b>Fibroblast Growth Factor</b>
<b>GAG</b>	<b>:</b>	<b>Glycosaminoglycane</b>
<b>GM-CSF</b>	<b>:</b>	<b>Granulocyte Macrophage Colony Stimulating growth Factor</b>
<b>IL</b>	<b>:</b>	<b>Interleukine</b>
<b>Lhx</b>	<b>:</b>	<b>Lim Homeobox Gene</b>
<b>LNA</b>	<b>:</b>	<b>Locked Nucleic Acid</b>
<b>LRAP</b>	<b>:</b>	<b>Leucine Rich Amelogenin Protein</b>
<b>MEC</b>	<b>:</b>	<b>Matrice Extracellulaire</b>
<b>MGP</b>	<b>:</b>	<b>Matrix Gla Protein</b>
<b>MMP</b>	<b>:</b>	<b>Matrix Metallo Proteinase</b>
<b>Msx</b>	<b>:</b>	<b>Muscle Segment HomeoboX</b>
<b>NE</b>	<b>:</b>	<b>Nœud de l'Email</b>
<b>OC</b>	<b>:</b>	<b>Ostéocalcine</b>
<b>OP</b>	<b>:</b>	<b>Ostéopontine</b>
<b>Pax</b>	<b>:</b>	<b>Paired Box</b>
<b>Pabx</b>	<b>:</b>	<b>Pseudo Autosomal Bondary region X linked</b>
<b>PG</b>	<b>:</b>	<b>ProteoGlycan</b>
<b>PM</b>	<b>:</b>	<b>Papille Méenchymateuse</b>
<b>PNF</b>	<b>:</b>	<b>Processus Naso Frontal</b>
<b>RANK</b>	<b>:</b>	<b>Receptor Activator of Nuclear factor Kappa b</b>
<b>RANK L</b>	<b>:</b>	<b>Receptor Activator of Nuclear factor Kappa b Ligand</b>
<b>RE</b>	<b>:</b>	<b>Réticulum Etoilé</b>
<b>RGD</b>	<b>:</b>	<b>Arginine Glycine Acid Aspartique</b>

<b>SF</b>	<b>:</b>	<b>Sac Folliculaire</b>
<b>SCPP</b>	<b>:</b>	<b>Secretory Calcium Binding PhosphoProtein</b>
<b>Shh</b>	<b>:</b>	<b>Sonic HedgeHog</b>
<b>SI</b>	<b>:</b>	<b>Stratum Intermedium</b>
<b>SIBLING</b>	<b>:</b>	<b>Small Integrin Binding Ligand N linked Glycoprotein</b>
<b>SPARC</b>	<b>:</b>	<b>Secreted Protein Acid and Rich in Cystein TIMP: Tissue Inhibitors of Metalloproteinases</b>
<b>TNAP</b>	<b>:</b>	<b>Tissus Non specific Alcaline Phosphatase</b>
<b>TGF<math>\beta</math></b>	<b>:</b>	<b>Transforming Growth Factor</b>
<b>TNF</b>	<b>:</b>	<b>Tumor Necrosis Factor</b>
<b>TRPV</b>	<b>:</b>	<b>Transient Receptor Potentiel Cation Channel Subfamily V</b>
<b>Wnt</b>	<b>:</b>	<b>Wint</b>
<b>ZR</b>	<b>:</b>	<b>Zone de Réflexion</b>

## I - Introduction : La Biominéralisation

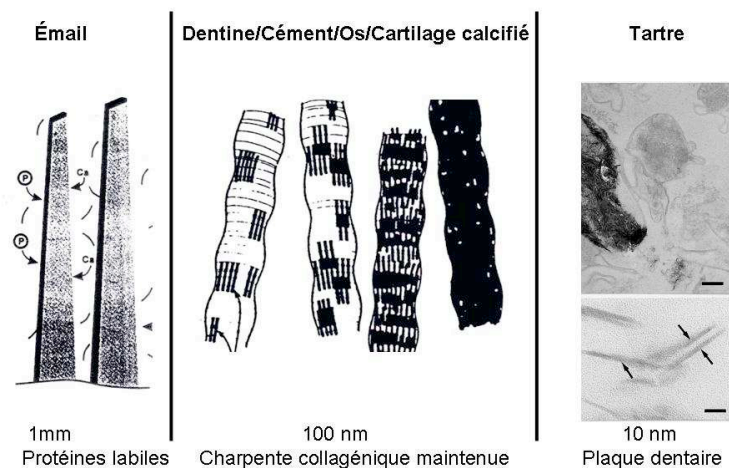
Les vertébrés dépendent des tissus squelettiques minéralisés pour leur soutien interne et leurs fonctions mécaniques, de locomotion et de mastication. Ils comprennent les os, les dents et le système vestibulaire de l'oreille interne (Kawasaki et coll., 2009).

Le squelette se compose principalement de phosphates de calcium sous forme d'hydroxyapatite, organisés sur une charpente matricielle. Cette singularité physiologique confère aussi aux tissus minéralisés des propriétés biochimiques de réservoir ionique (Ca, Na, P, Mg) pour l'organisme. Cependant, certains tissus sont capables de remaniement (tissu osseux en constant remodelage chez l'adulte par un équilibre stationnaire entre apposition et résorption). D'autres sont en sens unique d'apposition, sans remodelage en dehors de conditions pathologiques, comme l'émail, la dentine et le ciment dentaires (*Figure 1*).

La biominéralisation est un phénomène physico-chimique de passage du calcium et des phosphates de la phase ionique à la phase cristalline, apatitique. Ce sont, en fait, des assemblages à échelles multiples et à visée biomécanique.

Ce processus extracellulaire implique un édifice multimoléculaire avec une charpente structurale tissu-spécifique portant des sites anioniques guidant les étapes de la minéralisation. Ces sites sont présents dans une série de protéines de par leurs différentes modalités de modifications post-traductionnelles, glycosylation, sulfatation, phosphorylation ou carboxylation.

Ces sites anioniques contrôlent la concentration locale d'ions calcium et de phosphates extracellulaires apportés de manière contrôlée par l'activité des cellules. Leur assemblage dans des sites singuliers (os, émail, dentine et ciment) se déroule par étapes distinctes d'initiation du cristal d'apatite (nucléation), de croissance selon les différents axes du cristal et l'arrêt de sa croissance.



**Figure 1.** Apatites biologiques de différentes tailles en association avec des matrices spécifiques de tissu (Berdal, 2011, Cours P2, Paris-Diderot).

Ces processus extracellulaires sont sous la dépendance de cellules spécialisées (ostéoblastes-ostéocytes, améloblastes, odontoblastes et cémentoblastes-cémentocytes) qui produisent les molécules matricielles et contrôlent les effecteurs des transferts ioniques. Les différents tissus minéralisés chez l'homme sont à la fois semblables et différents par leur processus particulier de biominéralisation, suggérant qu'un mécanisme génétique partagé ou modulaire pourrait initier la biominéralisation. Il existe des témoignages d'un tel partage dans l'évolution moléculaire. Notamment l'existence de clusters de gènes sur des sites chromosomiques distincts. Cependant, une différence des voies génétiques du développement est indiquée par des recherches récentes. La biominéralisation est déterminée par différents systèmes génétiques tissu-spécifiques acquis au cours de l'évolution (Kawasaki et coll., 2009).

**Dans cette thèse**, les tissus minéralisés sont présentés selon différents points de vue : anatomique, cellulaire et moléculaire.

La singularité de l'équipe de recherche et du diplôme de doctorat est de considérer les phénomènes d'histogénèse et de biominéralisation de façon comparative intertissulaire. Les effecteurs analysés sont connus : **(1)** pour être communs à l'ensemble des tissus, les calbindines, la phosphatase alcaline et **(2)** les protéines de l'émail a contrario considérées historiquement comme exclusives à un tissu. De par l'évolution actuelle des données montrant leur expression extra-amélaire, ces dernières protéines sont systématiquement analysées dans l'ensemble des autres tissus dentaires et osseux dans ce mémoire.

**L'objectif de ce diplôme de doctorat** est de définir les conditions physiologiques d'expression de ces protéines et de leurs gènes qui avaient été étudiés essentiellement pour leur régulation au niveau de leurs promoteurs et *in vitro*. Les résultats obtenus permettent de proposer une classification des gènes analysés, en prenant comme premier critère, leur patron d'expression au cours de l'amélogénèse. En mettant en parallèle ces patrons avec ceux des facteurs de transcription montrés régulateurs de ces gènes *in vitro*, des hypothèses fonctionnelles ont été proposées. Elles ont été ensuite testées dans des conditions physiopathologiques de désordre systémique (bioinactivation de la vitamine D) et génétique (invalidation de l'homéogène Msx2). Les résultats obtenus, dans la première partie de la thèse, permettent de hiérarchiser la régulation de l'expression des effecteurs de la biominéralisation dans l'amélogénèse.

Les relations observées dans l'amélogénèse ont été secondairement mises en parallèle avec celles observées dans les autres tissus squelettiques. Elles permettent de proposer des schémas de régulation régionaux de la morphogénèse et de la biominéralisation dans les mâchoires. En effet, il existe une frontière dans ce champ scientifique entre la morphogénèse initiale pour laquelle des centres organisateurs ont été identifiés et caractérisés et les processus de régulation de la synthèse des matrices squelettiques considérés à une échelle cellulaire *in vitro* sans en envisager les aspects morphogénétiques. Les résultats de la thèse montrent une

continuité dans les facteurs de transcription impliqués au cours des phénomènes de morphogénèse initiale et tardive associée à l'histogénèse et à la biominéralisation.

Ces facteurs de transcription semblent opérer de façon itérative au cours des étapes clés associées à la biologie du développement précoce, à la croissance squelettique et à la physiologie adulte.

Leur impact sur l'expression des protéines de l'émail dans les tissus minéralisés se heurtait à une absence d'analyse quantitative de leur niveau d'expression différentiel dans les tissus dentaires épithéliaux, mésenchymateux et osseux selon leur site anatomique.

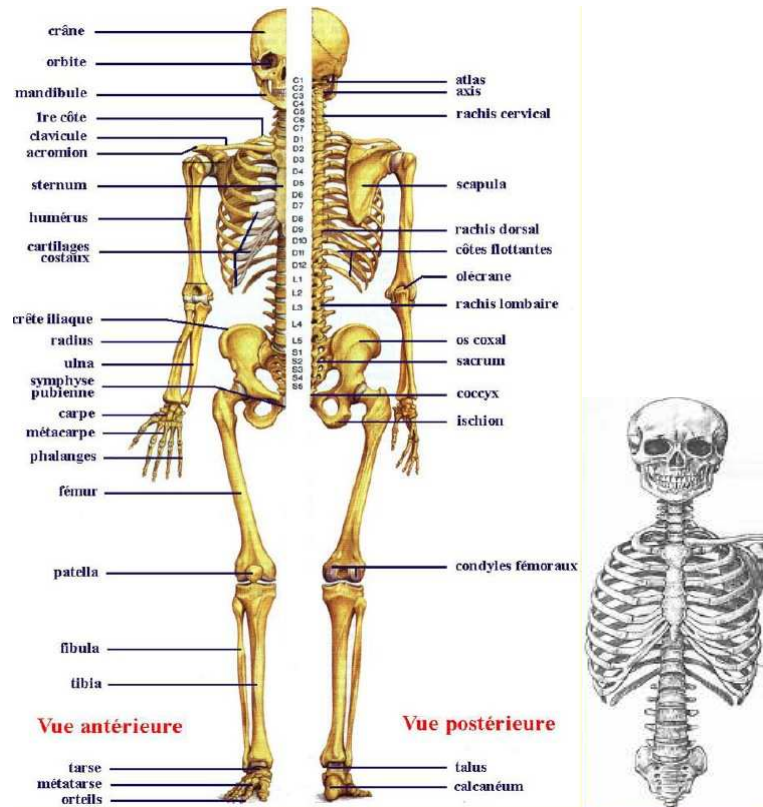
**La deuxième partie de la thèse** s'est attachée à résoudre cette question qui est actuellement bloquée par des verrous méthodologiques inhérents aux tissus minéralisés. La littérature est aujourd'hui contrastée, opposant une vision tissu-spécifique de l'expression des protéines de l'émail dans l'émail à une conception d'expression ubiquitaire.

Nos méthodologies quantitatives d'étude des ARNs aux protéines, associant systématiquement dosage sur extraits tissulaires et analyses *in situ*, dévoilent une situation intermédiaire entre ces deux extrêmes de la littérature. Il se dégage une hypothèse générale : L'expression des protéines de l'émail dans l'émail semblent associées à celle le tissu osseux qui sert d'ancrage et de support fonctionnel à la denture. Ainsi ces protéines multifonctionnelles de structure, de biominéralisation et de signalisation seraient reliées à la dent selon deux axes : celui du lignage cellulaire avec une origine embryologique neurectodermique commune de l'os des mâchoires et des dents et celui de contraintes environnementales liées aux fonctions singulières de la mastication. Le constat de l'expression marquée des protéines de l'émail dans les mâchoires comparativement aux os vertébraux et appendiculaires d'origine mésodermique pourraient constituer la clé du comportement physiopathologique sous chimiothérapie (ostéonécroses des mâchoires sous agents antirésorbants) ou de la réponse hormonale différentielle des os des mâchoires et du reste de l'os. Des approches transcriptomiques sont aujourd'hui conduites dans l'équipe, qui seront en mesure de mener plus avant la caractérisation fonctionnelle du squelette oral et bénéficieront des méthodes mises au point dans ce mémoire.

## II - ANATOMIE MACROSCOPIQUE ET MICROSCOPIQUE

### II.A. Le squelette

Le squelette est divisé en deux parties, le squelette axial et le squelette appendiculaire (Figure 2).



**Figure 2. Le squelette axial et appendiculaire**      **Le squelette axial**  
(Cours d'anatomie générale, Université Rennes 1)

Le squelette axial est situé sur le grand axe du corps formé de haut en bas :

- Le crâne
- L'os hyoïde
- La colonne vertébrale
- Les côtes
- Le sternum

Le squelette appendiculaire comprend de haut en bas :

- La ceinture scapulaire et les membres supérieurs
- La ceinture pelvienne et les membres inférieurs

Les os du corps humain sont classés selon 4 types (Figure 3) :

**\*Les os longs** (fémur, tibia, radius et cubitus) présentent un corps ou diaphyse et deux extrémités ou épiphyses. Diaphyse et épiphysse sont reliées par une zone qui est le siège de la croissance : la métaphyse ou

cartilage de croissance est aussi appelé cartilage de conjugaison. Celui-ci ne s'ossifie complètement qu'à la fin de la croissance (fémur et tibia).

La diaphyse : Elle est constituée de tissu compact épais, appelé corticale ou cortex. Elle est creusée du canal médullaire dans lequel se trouve la moëlle osseuse. La diaphyse est entourée d'une membrane tissulaire (le périoste) riche en vaisseaux sanguins nourriciers et qui participe à l'ossification en épaisseur.

Les épiphyses sont situées aux extrémités : une épiphyse distale (caudale) et une proximale (crâniale). Elles sont formées de tissu spongieux. Elles sont très riches en moëlle hématopoïétique. Elles sont recouvertes de cartilage articulaire.

**\*Les os plats** (sternum, côtes, scapula et os pariétaux) : Ils sont composés de deux couches d'os compact, les tables externe et interne, enfermant une couche d'os spongieux.

**\*Les os courts** (carpes, tarses) : Ils sont composés d'un noyau d'os spongieux entouré d'une corticale d'os compact.

**\*Les os irréguliers** n'appartiennent à aucun autre type d'os.

Les *os allongés* (métacarpiens, métatarsiens) : La longueur prédomine sur les autres dimensions, mais la taille de l'os est plus petite.

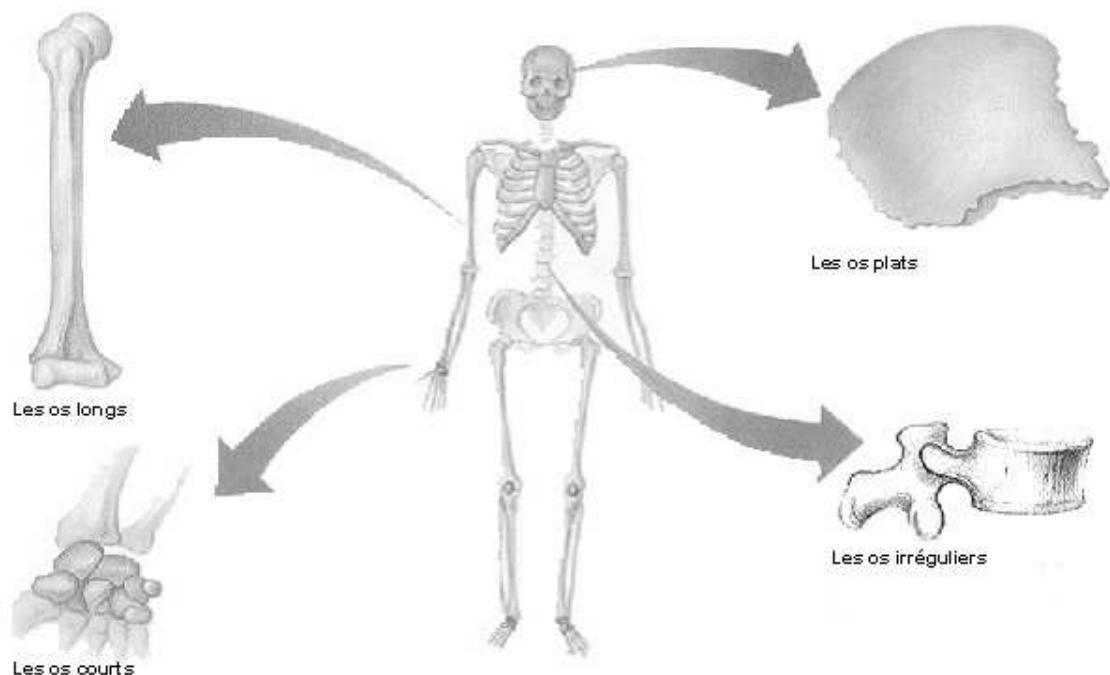
Les *os rayonnés* (les vertèbres) : Ils possèdent un corps duquel partent des expansions.

Les *os arqués* (la mandibule) : Ils ont deux formes : Simple courbure (les côtes) ou forme de fer à cheval.

Les *os papyracés* (os palatin) : Ils sont composés de fines lamelles osseuses.

Les *os pneumatiques* (les os de la face et du crâne) : Ils sont percés de cavités, appelées sinus.

Les *os sésamoïdes* (la rotule) : petits os annexés à des ligaments.



**Figure 3. Les 4 types d'os** (Cours d'anatomie générale, Université Rennes 1, 2008)

## II.B. Le squelette cranio-facial et dento-alvéolaire

Il est composé d'une mosaïque osseuse dont la mandibule, mobile, constitue à elle seule le massif inférieur (Figure 4).

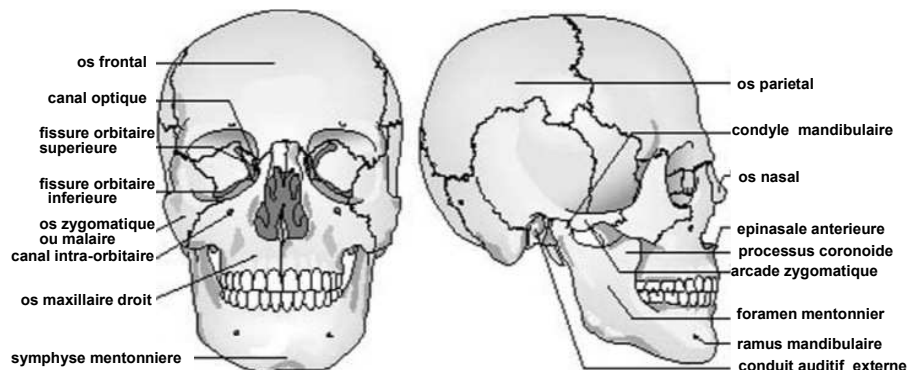
Cette mandibule est répartie en deux entités :

- une portion dentée horizontale
- un ramus, ou partie ascendante se terminant en avant par le processus coronoïde (ou coroné) donnant insertion au muscle temporal et, en arrière, le condyle articulaire qui s'articule avec le condyle de l'os temporal.

Le massif moyen est formé par les deux maxillaires réunis autour de l'orifice piriforme. Latéralement, l'os zygomatique (malaire) forme le relief osseux de la pommette et rejoint le processus zygomatique du temporal pour fermer la fosse temporale, coulisse du muscle du même nom. L'os nasal forme avec son homologue le faîte du toit nasal.

Le massif facial supérieur est cranio-facial :

- ethmoïdo-frontal médialement
- fronto-sphénoïdal au niveau du cône et du toit orbitaire, fronto-zygomatique latéralement.



**Figure 4. Éléments osseux constitutifs du massif facial**  
(Cours d'anatomie cranio faciale, Université Rennes 1, 2010)

Le tiers médian facial et les orbites sont directement en relation avec l'étage antérieur de la base du crâne. La mandibule est également en relation avec le crâne par l'intermédiaire de l'articulation temporo-mandibulaire, articulation bicondylienne à ménisque interposé, située juste en avant du conduit auditif externe (méat acoustique externe).



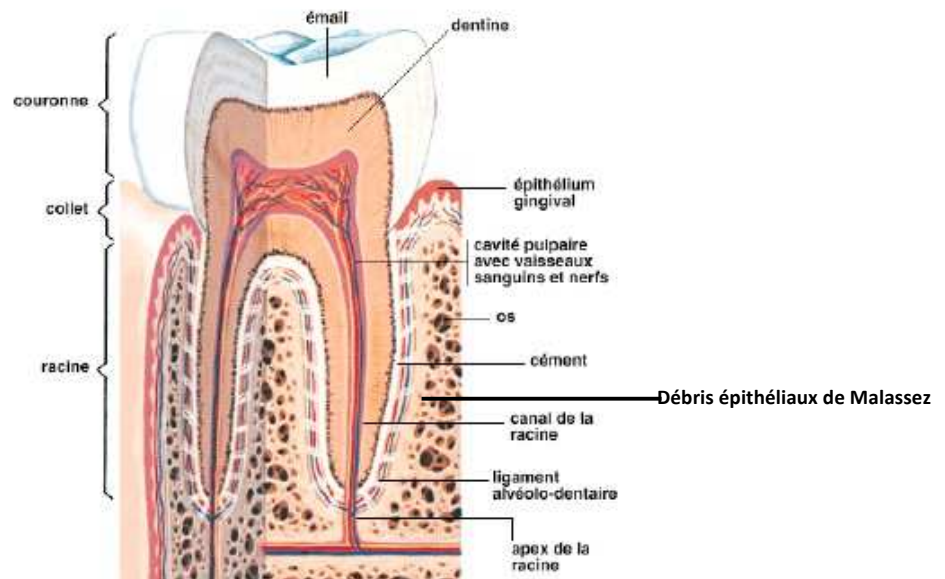
### **II.B.1. Dentures et dentition**

Les dents (*Figure 5*) font partie du système dento-alvéolaire comprenant :

- Le parodonte : ligament dento-alvéolaire, os alvéolaire, gencive (l'os alvéolaire naît et meurt avec la dent)
- La dent.

Les dents évoluent en trois stades :

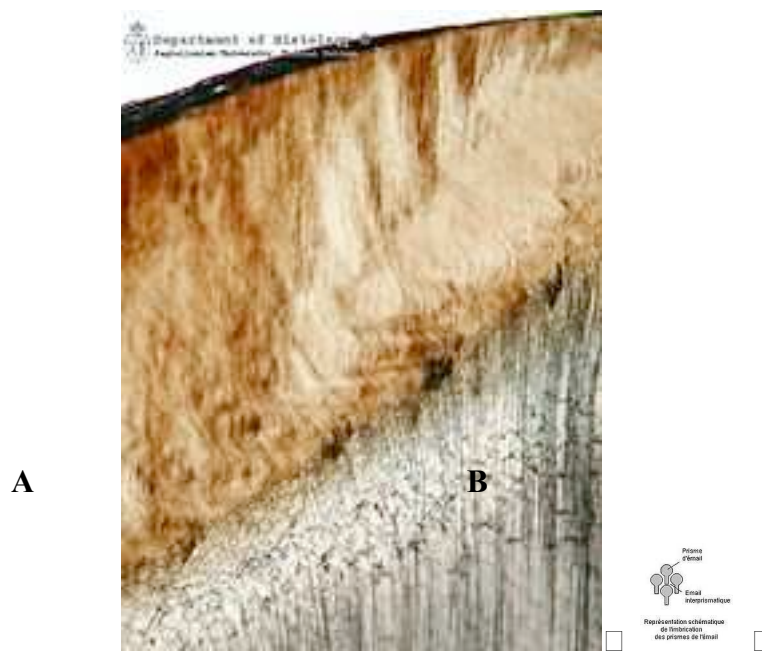
- Denture déciduale complète à 30 mois ;
- Denture mixte débutant à 7 ans ;
- Denture définitive en place à partir de 12 ans.



**Figure 5. La dent et son parodonte** (*Cours d'anatomie cranio faciale, Université Rennes 1, 2010*)

#### **II.B.1.a. L'émail**

L'émail recouvre la couronne dentaire jusqu'au collet. L'émail est un tissu inerte, non innervé et acellulaire (*Figure 6*). C'est la structure la plus dure de l'organisme. C'est également le tissu le plus minéralisé. Sa richesse en sels minéraux atteint 95% environ de son poids. Sa partie minérale est essentiellement phosphocalcique. L'émail est un tissu translucide. Il a une structure prismatique. Les prismes d'émail démarrent perpendiculairement à la limite émail-dentine (appelée également jonction amélo-dentinaire) et forment un maillage complexe qui confère une solidité additionnelle à l'émail.



**Figure 6. A :** Email (haut) et dentine (bas) chez le rat. **B :** Représentation de la disposition de prismes dans l'émail (*Department of Histology, University of Arkansas, USA*)

#### **II.B.1.b. La dentine**

La dentine se situe sous l'émail coronaire et le cément radiculaire (*Figure 6*). C'est le tissu dentaire qui a le volume le plus important. La dentine est moins dure que l'émail. Elle contient 70% de sels minéraux et 30% de trame organique constituée essentiellement par des collagènes. La dentine ne contient pas de cellules enfermées dans des lacunes mais des prolongements cellulaires, ce qui la différencie de l'os. Elle possède une structure poreuse. Elle est parcourue par des canalicules dentinaires dans lesquelles circulent les prolongements de Tomes. Les prolongements de Tomes émanent de cellules situées en périphérie de la pulpe : les odontoblastes.

#### **II.B.1.c. La pulpe dentaire**

C'est une masse conjonctivo-vasculaire qui occupe la cavité centrale de la dent : la cavité pulpaire. Sa forme est, en réduction, celle du contour extérieur de la dent, à chaque cuspide des dents pluricuspidées correspond une corne pulpaire. A la périphérie de la pulpe, en contact avec la dentine, on trouve les odontoblastes, cellules sécrétrices de la matrice dentinaire. La région de la pulpe correspondant à la couronne dentaire s'appelle la pulpe camérale, elle est contenue dans la cavité pulpaire. On lui décrit un plafond et un plancher. La pulpe correspondant aux racines est constituée par les filets radiculaires contenus dans les canaux radiculaires.

La communication de la pulpe avec le conjonctif alvéolaire s'effectue par l'intermédiaire des canaux radiculaires dont l'ouverture se fait à l'apex de la dent. Les filets radiculaires peuvent être multiples dans cette zone de l'apex de la dent. Il existe toujours un canal principal qui peut se diviser en canaux secondaires.

La pulpe est composée de tissu conjonctif, de fibres collagènes, de vaisseaux sanguins, de vaisseaux lymphatiques et de fibres nerveuses. La pulpe dentaire sert à la fabrication de la dent pendant la période embryologique et tout au long de la vie ainsi qu'à la défense immunitaire, la nutrition, au métabolisme et à la nociception de la dent.

#### **II.B.1.d. Le ciment**

Le ciment est considéré comme faisant partie du parodonte. C'est un tissu minéralisé qui recouvre toute la surface externe de la dentine radiculaire. Il est invisible de l'extérieur car il est recouvert par le ligament alvéolo-dentaire et par l'épithélium gingival. Au niveau du collet, il fait suite à l'émail.

Le ciment est un tissu calcifié analogue à l'os. Il a une teneur en sels minéraux réduite (45% environ, alors que la dentine en contient 70% et l'émail 95%). Il est élaboré pendant la formation de la dent et tout au long de la vie. Sous l'effet de stimulations physiopathologiques, il peut, comme l'os, subir des remaniements (résorption, apposition). Il joue également un rôle dans la protection de la dentine.

Le ciment permet l'accrochage du ligament parodontal, de l'os alvéolaire à la racine de la dent. Les fibres desmodontales sont fixées au ciment et à l'os alvéolaire. Le ciment assure donc l'attache et la fixation de la dent.

### **II.C.1. Origine et formation du squelette**

#### **II.C.1.a. Origine embryologique du squelette**

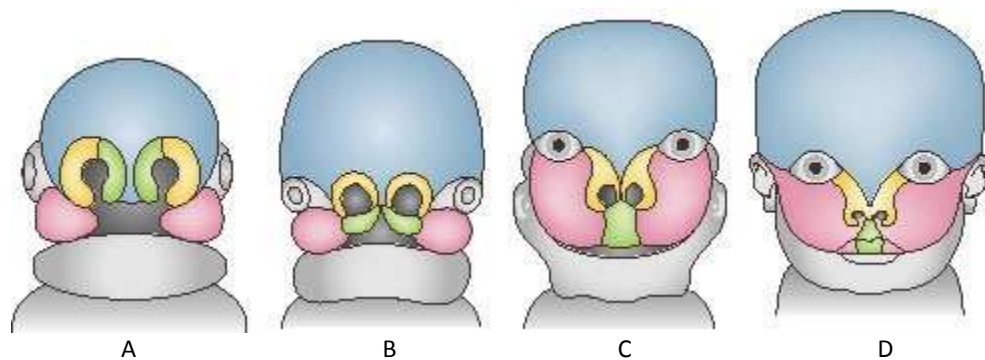
Au stade de la gastrulation, des mouvements cellulaires de grande ampleur affectent l'ensemble de l'embryon. Des remaniements cellulaires en sont issus et redistribuent les tissus embryonnaires. Les trois feuillets originaux, ectoderme, mésoderme et endoderme sont organisés de manière concentrique : l'endoderme profond, l'ectoderme superficiel et le mésoderme en position intermédiaire. Une nouvelle cavité est formée au détriment du blastocoèle : l'archentéron. L'environnement de chaque cellule change, ce qui génère de nouveaux contacts entre les tissus. Ainsi, au cours de l'invagination, des contacts qui s'établissent entre le mésoderme dorsal et l'ectoderme sont une des composantes de l'induction du neurectoderme. Le modelage de l'embryon peut alors commencer avec l'apparition des ébauches d'organes et l'élaboration du squelette. Les cellules squelettiques ont des origines différentes suivant leur site anatomique. Les cellules osseuses dérivent du mésoderme dans le squelette vertébral et appendiculaire. Pour le territoire maxillo facial, elles proviennent du neurectoderme par l'intermédiaire des crêtes neurales céphaliques qui migrent latéralement et antérieurement.

#### **II.C.1.b. Morphogenèse faciale humaine**

Au début de la quatrième semaine du développement, l'extrémité céphalique de l'embryon est grossièrement arrondie. Peu à peu, se développent des renflements (les bourgeons faciaux) qui s'organisent autour d'une dépression – le stomodéum (bouche primitive) – provisoirement obturée par la membrane pharyngienne.

Ces bourgeons sont constitués de tissu ectomésenchymateux dérivés des crêtes neurales (au sein duquel se développent les structures cartilagineuses, musculaires et osseuses) et d'un revêtement épiblastique. Vers la cinquième semaine (*Figures 7A, 7B*), on distingue :

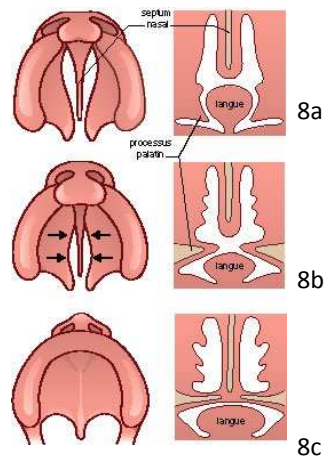
- Le bourgeon frontal (BF), médian, présentant latéralement trois paires de différenciation épithéliale : les placodes olfactives, optiques et otiques. Ce bourgeon donnera à partir de la sixième semaine les bourgeons nasaux internes (BNI) et les bourgeons nasaux externes (BNE) droits et gauches, séparés par le processus naso-frontal (PNF) ;
- Les deux bourgeons maxillaires supérieurs (BMS) ;
- Les deux bourgeons mandibulaires ou maxillaires inférieurs (BMI), issus du premier arc branchial.



**Figure 7.** Les bourgeons faciaux et leur développement : **7A** = 3 semaines ; **7B** = 7 semaines ; **7C** = 10 semaines ; **7D** = Face constituée (*Collège français de chirurgie maxillo faciale et stomatologique, 2008*)

Ces bourgeons se modifient en forme et en volume et s'organisent autour des placodes sensorielles et du stomodéum. Ils tendent à fusionner par phénomènes de confluence et de soudure jusqu'au troisième mois (*Figures 7C, 7D*).

Le cloisonnement de la bouche primitive se fait par la fusion sur le plan médian des bourgeons nasaux et maxillaires supérieurs, qui vont former à la partie antérieure de la bouche primitive le palais primaire vers la septième semaine. En même temps, se développent une lame médiane (la cloison nasale) et deux lames latérales (les processus palatins) qui fusionnent pour donner le palais secondaire après abaissement de la langue entre la septième et la dixième semaine (*Figure 8*).



**Figure 8. Le cloisonnement de la bouche primitive : 8a = 7 semaines ; 8b = 8 semaines ; 8c = 10 semaines.**  
*(Collège français de chirurgie maxillo faciale et stomatologique, 2008)*

L'arc I (arc mandibulaire) donne à sa partie supérieure les deux bourgeons maxillaires supérieurs et, dans son centre, les deux bourgeons mandibulaires. L'épiblaste qui recouvre cet arc donne l'émail dentaire, les glandes salivaires, la muqueuse buccale et une partie du pavillon de l'oreille. L'arc II (arc hyoïdien) se développe considérablement jusqu'à recouvrir les arcs III et IV et donne la région hyoïdienne. Les arcs III, IV et V involuent.

### **III - LES TISSUS MINERALISES : ASPECTS CELLULAIRES**

La formation, puis la physiologie du squelette est assurée par un nombre restreint de types cellulaires (ostéoblastes, chondroblastes, améloblastes, odontoblastes, cémentoblastes) qui, malgré des caractéristiques communes, présentent des spécificités.

La compréhension des mécanismes conduisant à une expression différentielle des protéines responsables de leurs spécificités phénotypiques représente un des axes de recherche actuels. L'origine embryologique de ces tissus et leurs régulations génétiques participeraient à l'acquisition de leur profil tissulaire singulier et d'une identité positionnelle. Les ostéoclastes sont, quant à eux, spécialisés dans la résorption de l'os.

#### **III.A. Le tissu osseux**

L'os a 3 fonctions :

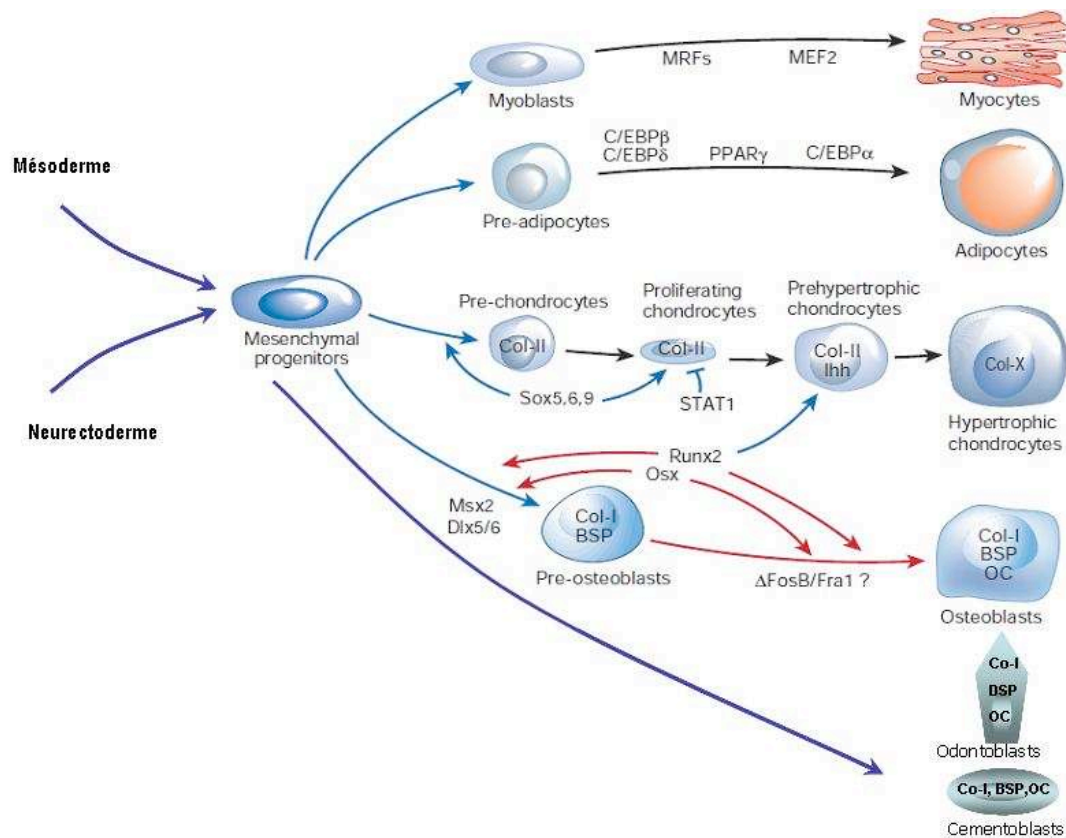
- 1°) Une fonction mécanique : le tissu osseux va supporter les contraintes mécaniques, avec des spécialisations régionales : la posture pour l'axe vertébral et les membres inférieurs, la protection des organes centraux (le cerveau), neurosensoriels (yeux, nerfs), viscéraux, la locomotion, la gestuelle, tous les micro et macromouvements liés à la manducation : mastication, phonation, déglutition. Ceci implique que les contraintes mécaniques sont hétérogènes en intensité et en fréquence dans les différentes régions du squelette.

- 2°) Une fonction métabolique : le tissu osseux est dynamique sur le plan métabolique. Il constitue un réservoir, contenant 90% de calcium, 85% de phosphore, 90% de sodium et 50% du magnésium corporels. Il est constamment remodelé sous l'effet des pressions mécanique et de régulations systémiques, entraînant la libération ou le stockage de sels minéraux, et assurant ainsi dans une large mesure (conjointement avec l'intestin et les reins) le contrôle du métabolisme phosphocalcique. Les ions (Ca, P et Na) sont impliqués dans de nombreux processus physiologiques (conduction nerveuse, contraction musculaire et signalisation cellulaire) et sont associés aux cristaux osseux.
- 3°) Fonction hématopoïétique : les os renferment dans leurs espaces médullaires, la moëlle hématopoïétique, dont les cellules souches, à l'origine des 3 lignées de cellules sanguines, se trouvent au voisinage des cellules osseuses. Les cellules stromales de la moëlle osseuse fournissent un support structural et fonctionnel aux cellules hématopoïétiques. Certaines d'entre elles sont des cellules-souches multipotentes ayant la faculté de se différencier dans de multiples lignages (fibroblastes, chondrocytes, ostéoblastes, adipocytes, myoblastes,...).

### **III.A.1. Les cellules osseuses**

#### **III.A.1.a. Les préostéoblastes**

Ils sont issus des cellules mésenchymateuses qui peuvent également emprunter la voie cartilagineuse, musculaire ou adipocytaire (*Figure 9*) (Pittenger et coll., 1999 ; Ducy et coll., 2000). L'engagement des cellules mésenchymateuses dans une voie de différenciation ostéoblastique est contrôlé par de multiples facteurs, tels que des facteurs de transcription, des facteurs de croissance, des hormones, mais également par la matrice extracellulaire (MEC).



**Figure 9.** Les différentes voies de différenciation des cellules mésenchymateuses (modifiée d'après Harada et Rodan, 2003).

Les cellules ectomésenchymateuses issues du neuroectoderme présentent les capacités additionnelles de donner naissance aux odontoblastes, aux cémentoblastes et à des fibroblastes du ligament et de la gencive.

### III.A.1.b. Les ostéoblastes

Les ostéoblastes synthétisent une matrice non minéralisée, le tissu ostéoïde, qu'ils déposent à la surface osseuse sous la forme d'une couche d'épaisseur variable. Ils synthétisent également une phosphatase alcaline, enzyme impliquée dans les mécanismes de minéralisation de la matrice. La biominéralisation se fait à partir de l'interface entre le tissu osseux et le tissu ostéoïde. Ce front de minéralisation progresse à la vitesse de 0,70  $\mu\text{m}/\text{jour}$  vers la surface osseuse. L'activité de formation peut être mesurée grâce à la technique du double marquage par des agents fluorescents. Le devenir des ostéoblastes est double : certains s'enfermant dans la matrice osseuse qu'ils ont contribué à synthétiser se transforment en ostéocytes (environ 1/40), les autres deviennent des cellules aplaties, quiescentes, qui vont recouvrir la totalité des surfaces osseuses. Ces cellules sont appelées cellules bordantes (lining cells). Elles sont disposées sur une très fine couche collagénique qui ne se minéralise pas. Entre la moelle osseuse et le tissu osseux, se trouve toujours cette couche continue de cellules bordantes.

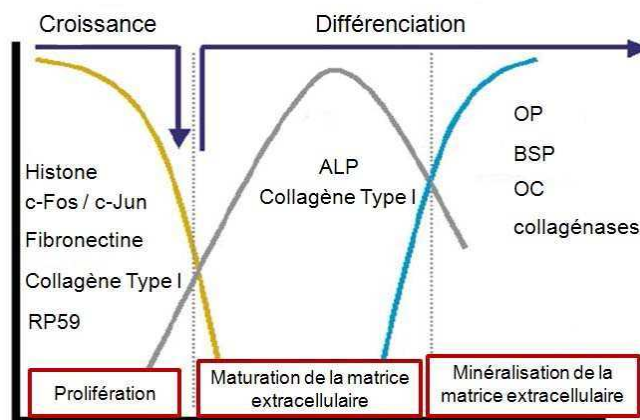
En microscopie électronique, les ostéoblastes présentent de nombreuses et longues expansions cytoplasmiques (permettant la communication des cellules entre elles). Les organites nécessaires à la synthèse de protéines et de glycoprotéines sont abondants. Les mitochondries sont nombreuses, riches en granules

denses de phosphate tricalcique. Les ostéoblastes élaborent la matrice osseuse et jouent un rôle important dans la phase initiale de la minéralisation.

### III.A.1.c. La différenciation ostéoblastique

La différenciation ostéoblastique se caractérise par l'engagement et la prolifération de cellules ostéoprogénitrices qui, après arrêt de la multiplication cellulaire, se différencient en ostéoblastes fonctionnels chargés de la synthèse et de la minéralisation de la matrice osseuse. Au cours de ce processus, de nombreux marqueurs sont exprimés de façon séquentielle (*Figure 10*), ce qui a permis de concevoir un programme de différenciation de l'ostéoblaste en trois grandes étapes :

- 1) Le recrutement et la prolifération de cellules ostéoprogénitrices
- 2) La synthèse, la maturation et l'organisation de la matrice extracellulaire
- 3) La minéralisation de la matrice extracellulaire



**Figure 10.** Profil d'expression des différents marqueurs au cours des étapes de la différenciation ostéoblastique (*modifiée d'après Stein et coll., 2004*).

### III.A.1.d. La matrice extracellulaire osseuse (MEC)

La matrice extracellulaire osseuse contient 50% d'eau et des glycoprotéines tels que les collagènes essentiellement de type I et toute une série de protéines non collagéniques. Le collagène de type I constitue le support principal de la minéralisation et compose la charpente du tissu osseux ; il assure la résistance et l'élasticité de l'os, des propriétés dépendantes de la quantité et de la qualité du collagène synthétisé.

Le site RGD de ces constituants protéiques est reconnu par une certaine classe de récepteurs cellulaires, les intégrines, et permet l'adhésion des cellules osseuses à la matrice extracellulaire.

Cette matrice présente une forte affinité pour les ions. Les sels minéraux qui s'intègrent et imprègnent la matrice osseuse sont des sels de calcium (phosphate tricalcique, bicarbonate de calcium, fluorure de calcium, citrate de calcium), ainsi que les sels de magnésium et de strontium. Ils représentent 99% des réserves de



calcium de l'organisme (environ 1100 gr) et 90% des réserves de phosphore (environ 600 gr). L'essentiel des sels minéraux se présente, dans la matrice osseuse, sous forme de cristaux d'hydroxyapatite imparfaite proche de la formule  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ . Ces cristaux, mesurant 40 à 200 nm de long et 25 nm de large pour une épaisseur de 5 nm, sont situés soit entre les fibres collagènes, soit dans les fibres collagènes. Un dixième des atomes constituant les cristaux sont situés à leur surface (expliquant ainsi la rapidité des échanges calciques dans le tissu osseux). La surface totale d'échange au niveau des cristaux d'hydroxyapatite représente environ 130 m<sup>2</sup>/gr d'os.

### **III.A.1.e. La minéralisation de la matrice extracellulaire**

Au début de la phase de minéralisation de la MEC, les ostéoblastes différenciés et fonctionnels expriment des marqueurs de la différenciation tardive : l'ostéopontine (OP), la sialoprotéine osseuse (BSP) ou encore l'ostéocalcine (OC). L'activité des cellules ostéoblastiques est régulée par un contrôle réciproque de la prolifération et de la différenciation cellulaire (Hassan, 2010). Ainsi, l'augmentation de l'expression des protéines matricielles pendant la prolifération inhibe cette dernière et favorise l'expression de marqueurs plus tardifs, qui eux-mêmes favorisent la minéralisation, activité hautement spécialisée de l'ostéoblaste mature.

Le transport du calcium, du milieu extracellulaire aux sites de nucléation présents dans le collagène, se fait par diffusion passive mais également par transfert actif, grâce à des pompes à calcium présentes dans la membrane de l'ostéoblaste et à des protéines de liaison au calcium telles que la calmoduline ou les calbindines-D<sub>9k</sub> et D<sub>28k</sub>.

Les ions phosphate sont également transférés vers la MEC de manière passive ou active, par l'intermédiaire d'un système de transport cellulaire dépendant du sodium. Par ailleurs, le transport des ions calcium et phosphate hors de la cellule est également assuré par des vésicules matricielles extracellulaires, issues du bourgeonnement des membranes plasmiques des ostéoblastes et des chondrocytes. Ces vésicules, composées de protéines et de phospholipides, constituent également un microenvironnement permettant la nucléation de cristaux d'hydroxyapatite, qui seront libérés dans les fluides extracellulaires à proximité des zones de minéralisation (pour revue, Anderson, 2005).

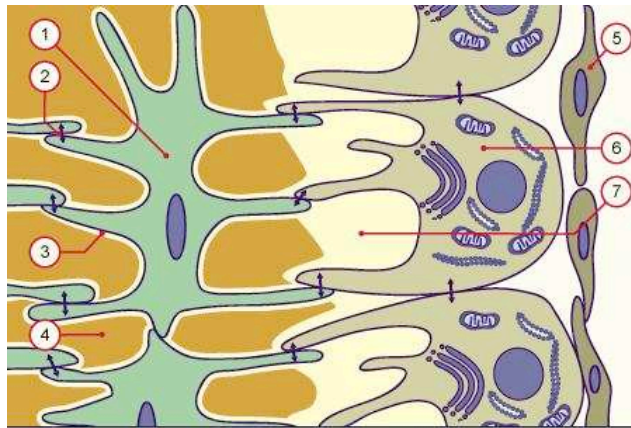
Les relations étroites entre la phase minérale et les striations périodiques du collagène ont conduit à l'hypothèse que la minéralisation s'effectue par nucléation hétérogène dans les zones trouées ou « hole zones » de la fibre de collagène (Rey et coll., 2009).

La minéralisation implique aussi une glycoprotéine membranaire non tissu-spécifique, la phosphatase alcaline (TNAP). La TNAP est considérée comme un marqueur précoce de la différenciation ostéoblastique, car elle est fortement exprimée par les cellules ostéoblastiques post-prolifératives lors de la maturation de la MEC (Kim, 2004). Bien que la fonction de cette enzyme ne soit pas encore complètement déterminée, son rôle présumé dans le processus de minéralisation et plus spécifiquement dans son initiation est reconnu.

### III.A.1.f. Les ostéocytes

Les ostéocytes sont les cellules les plus nombreuses de l'os. Elles représentent 90% à 95% de la population cellulaire osseuse dans le squelette adulte. Les ostéoblastes représentent moins de 5%, et les ostéoclastes moins de 1%. Les ostéocytes ont une durée de vie beaucoup plus importante (des dizaines d'années) que les ostéoblastes qui ont une durée de vie de quelques semaines et les ostéoclastes, de quelques jours (Bonewald, 2007).

L'ostéocyte est un ostéoblaste non-prolifératif inclus d'abord dans la matrice ostéoïde. Il s'agit alors d'un ostéocyte immature. Lorsque la matrice ostéoïde qui l'entoure est minéralisée, cet ostéocyte immature se différencie en un ostéocyte mature. Il est situé dans l'épaisseur des travées osseuses au sein d'une logette entourée de matrice osseuse, l'ostéoplaste, vers lequel aboutit un réseau de canalicules. En effet, les ostéocytes émettent de nombreux prolongements cytoplasmiques qui traversent la matrice par les canalicules, élaborant ainsi un réseau structuré au sein de la matrice. Ce réseau ou *syncytium* permet à l'ostéocyte d'être en contact avec les autres cellules osseuses (ostéocytes, ostéoblastes, cellules bordantes et autres cellules présentes dans la moelle osseuse), par des jonctions cellulaires «gap junctions» établies avec leurs prolongements cytoplasmiques (Figure 11).



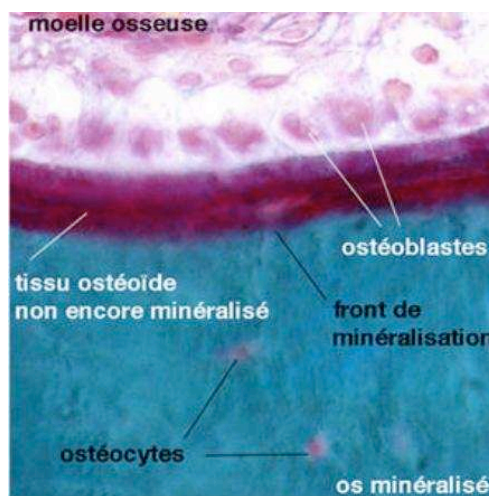
**Figure 11. Ostéoblastes et ostéocytes** (Clarke, 2008). **1** : ostéocyte ; **2** : Gap junction entre les ostéocytes ; **3** : bordure ostéoïde (non minéralisée) ; **4** : os minéralisé ; **5** : cellules ostéoprogénitrices ; **6** : ostéoblastes. **7** : ostéoïde

Les activités des ostéocytes sont modulées :

- par les contraintes mécaniques dont les stimuli sont transmis aux ostéoblastes, *via* les ostéocytes.
- par des facteurs généraux, hormonaux le plus souvent (hormone parathyroïdienne, calcitonine, 1-25 dihydroxyvitamine D, oestrogènes, glucocorticoïdes...), qui dépendent en grande partie des conditions métaboliques générales et du métabolisme phosphocalcique en particulier.
- par la production de cytokines ou de facteurs de croissance par les cellules osseuses elles mêmes et les cellules de la moëlle hématogène proche (IL-1, IL-6, IL-11, GM-CSF, TGF...).

Les fonctions des ostéocytes : Les ostéocytes sont des cellules mécano-réceptrices. Ils sont sensibles aux contraintes mécaniques qui s'exercent sur la matrice osseuse et aux variations de pression des liquides interstitiels de la matrice. Ils détectent également le besoin d'une augmentation ou d'une diminution de la formation osseuse au cours du processus d'adaptation fonctionnelle. Les stimuli mécaniques externes, probablement transmis à l'ostéocyte par des flux de substance contenue dans ces canalicules, vont induire des réponses ostéocytaires (Noble, 2008). Les ostéocytes pourraient ainsi moduler l'activité des ostéoblastes et des autres cellules osseuses pour permettre l'agencement et l'adaptation de l'architecture osseuse et assurer une résistance optimale du tissu osseux aux contraintes physiques. L'ostéocyte peut également modifier son microenvironnement en modulant la taille de la lacune dans lequel il réside. Les ostéocytes produisent des molécules capables de modifier localement le degré de minéralisation de la matrice qui les entoure et des facteurs pouvant stimuler la production ostéoblastique de MMP (Noble, 2008) (Figure 12).

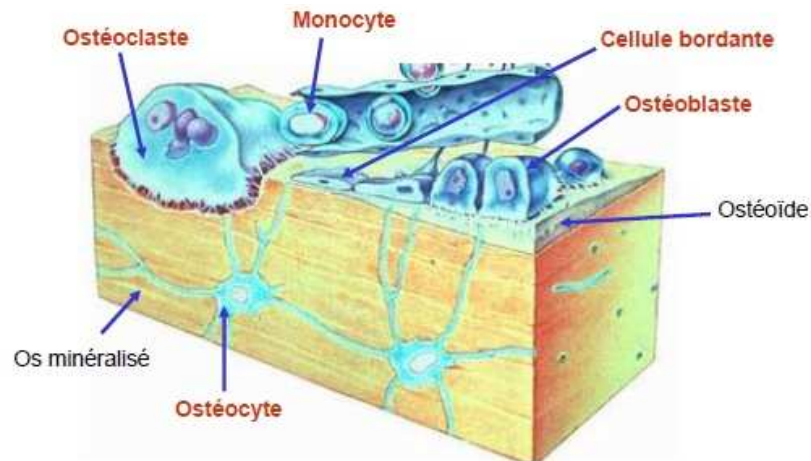
L'ostéocyte est ainsi capable de résorber la MEC au cours d'un processus appelé «résorption péri-ostéocytaire» (Bonewald, 2007).



**Figure 12.** Minéralisation osseuse (Heymann, 2008)

### **III.A.1.g. Modelage, remodelage et ostéoclastes**

Le tissu osseux est constamment remanié par l'activité d'une deuxième catégorie de cellules osseuses, les ostéoclastes d'origine monocytaire. Des signaux provenant des ostéoblastes et des cellules mésenchymateuses stimulent la différenciation et la résorption osseuse. La voie cardinale impliquée dans ce processus est celle d'un récepteur de la superfamille des TNF, RANK porté par les préostéoclastes et les ostéoclastes. Son ligand, RANK ligand, est synthétisé par les ostéoblastes ainsi qu'un récepteur leurre, l'ostéoprotégérine, qui est un antagoniste de la stimulation de RANK par RANK ligand. Ainsi, les communications cellulaires entre les cellules impliquées dans la fabrication de la matrice osseuse et celles impliquées dans sa résorption permettent d'harmoniser ces deux activités dans des contextes physiologiques singuliers de la croissance et de l'homéostasie (Figure 13).



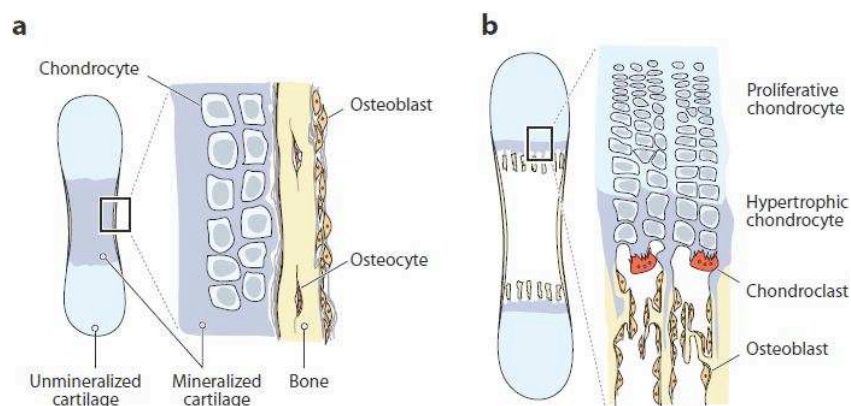
**Figure 13. Les ostéoclastes** (Cours de médecine, Université Pierre et Marie Curie, 2005)

Les ostéoclastes fonctionnels sont des cellules post-mitotiques, très volumineuses, plurinucléées, hautement mobiles, capables de se déplacer à la surface des travées osseuses d'un site de résorption à un autre. Lorsqu'il est activé, l'ostéoclaste, cellule ostéorésorbante, développe son appareil lysosomal et se polarise fortement ; sa membrane plasmique se différencie en deux domaines séparés par un anneau étanche de jonctions cellule-MEC : un domaine apical qui développe une *bordure en brosse* au contact de la surface osseuse et un domaine basolatéral situé à l'opposé.

### III.A.2. Processus d'ossification et particularités des os crâniofaciaux

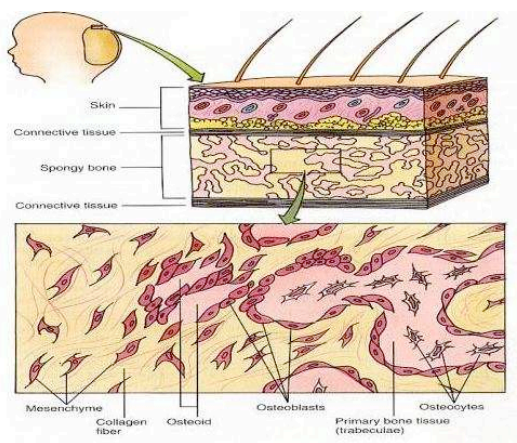
La formation des os débute vers la 9e semaine chez le fœtus. Elle se fait à partir d'une maquette cartilagineuse ou d'un blastème mésenchymateux par deux types d'ossification différents : l'ossification endochondrale et l'ossification membraneuse.

Le squelette vertébral et appendiculaire ainsi que les os du pelvis, la base du crâne et les articulations de la branche montante de la mandibule se minéralisent par ossification endochondrale (Figure 14).



**Figure 14. Ossification endochondrale** (Mark, 2007)

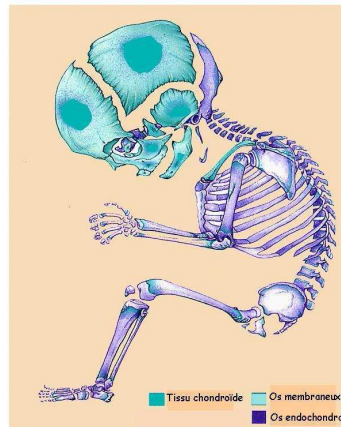
Au cours de l'ossification endochondrale, La formation osseuse se fait à partir d'une maquette cartilagineuse. Le contrôle et la coordination des différents compartiments (prolifératif, mature, apoptotique) et la virole osseuse péri-chondrale initient la morphogenèse des pièces osseuses. L'ossification endochondrale débute par des centres d'ossification primaires dans la partie moyenne de la matrice cartilagineuse. Contrairement à l'ossification membraneuse (*Figure 15*), elle ne consiste pas en une transformation du tissu cartilagineux en tissu osseux. Elle se fait en deux étapes : une destruction de la matrice cartilagineuse puis son remplacement par du tissu osseux. L'ossification primaire du péri-chondre (futur périoste) entraîne une transformation des chondrocytes : ils s'hypertrophient et dégènèrent. Dans cette zone hypertrophique, les sels de calcium précipitent et donnent un cartilage calcifié. Les chondrocytes inclus dans cette matrice calcifiée, dégènèrent et ne sécrètent plus d'angio-inhibiteur. Il se produit une néovascularisation ; les chondroclastes creusent des cavités dans le cartilage calcifié. Les fragments de cartilage échappant aux chondroclastes servent de supports aux préostéoblastes arrivés avec les bourgeons vasculaires. Les préostéoblastes donnent des ostéoblastes qui sécrètent la matrice ostéoïde, celle-ci se minéralise pour donner de l'os. Les ostéoclastes sont à l'origine du canal médullaire. En périphérie, on retrouve la plaque épiphysaire qui contient du cartilage hyalin, du cartilage sérié (dû à la prolifération active des chondroblastes), du cartilage hypertrophique, du cartilage hypercalcifié, une ligne d'érosion (qui résulte de l'action des chondroclastes), une zone ostéoïde et une zone ossifiée. Cette plaque persiste jusqu'à ce que l'os ait atteint sa taille adulte. Quand le cartilage disparaît, les épiphyses et les diaphyses fusionnent : la croissance est terminée. L'ossification endochondrale est à l'origine de la croissance en longueur des os. Le gène maître de cette formation cartilagineuse est Sox9.



**Figure 15. Ossification membraneuse** (*Gartner et Hiatt, Color Textbook of Histology, 2010*)

L'ossification membraneuse est celle des os de la voûte crânienne et des maxillaires ; elle a une origine mésenchymateuse. Au cours de l'ossification membraneuse, les cellules mésenchymateuses prolifèrent au sein d'une condensation puis se différencient in situ en ostéoblastes. Il y a production de matrice ostéoïde. Cela a lieu dans des zones particulières dites « centre d'ossification primaire ». Elles sont peu minéralisées. Après la

naissance, ces zones fusionnent et se minéralisent complètement (Figure 16). Runx2 est le facteur clef de ce processus.



**Figure 16. Ossification membranaire et endochondrale du squelette** (Origine, thèse Lengelé, Bruxelles, 2000)

Le squelette diverge dans son origine embryologique, mésoderme pour la région vertébrale et appendiculaire, crêtes neurales céphaliques pour la région crânio-faciale.

Le squelette crâniofacial doit être considéré à part des autres tissus squelettiques. Leurs origines embryologiques différentes conduisent très certainement à des mécanismes de formation et de signalisations particuliers encore mal connus. De plus, le squelette crânio-facial abrite des structures hétérogènes et vitales, cerveau, organes des sens, dents dont le développement influence la formation osseuse. A la différence des autres os endochondraux, la croissance de la base du crâne est sous la dépendance de la croissance cérébrale (Verma et coll., 2009). Lors du développement du squelette crânio-facial, deux phases chevauchantes peuvent être observées : la morphogenèse précoce, qui voit la mise en place des patrons développementaux et la morphogenèse tardive, qui correspond à l'histogenèse et à la minéralisation.

Les cellules mésenchymateuses du procès mandibulaire et du cartilage de Meckel interagissent avec l'épithélium mandibulaire pour initier la différenciation des cellules osseuses (Merida-Velasco et coll., 1993). Le développement des mâchoires est étroitement lié à la morphogenèse dentaire (Satokata et Maas, 1994 ; Van Genderen et coll., 1994). Les mâchoires se modèlent et se remodelent en parfaite harmonie avec la taille, la forme, la position et la fonction des dents.

L'os alvéolaire doit être considéré comme un troisième tissu osseux particulier. Il se développe à partir d'interactions épithélio-mésenchymateuses. C'est le seul os de l'organisme dont l'absence de stimulation conduit à une perte anatomique. La perte de la dent peut conduire à sa complète disparition.

Sur le plan moléculaire, on trouve des différences entre le calvaria et la base du crâne (Nie, 2006). De plus, il existe des différences moléculaires dans les processus de différenciation des cellules osseuses squelettiques et des cellules osseuses issues de l'os alvéolaire. Il n'y a notamment une absence d'expression du facteur Ostérix dans ces dernières et un profil différent d'expression des homéogènes Dlx5 et Msx2 (Wurtz et Berdal., 2003) ainsi que de Runx2 par rapport à la calvaria (Morsczeck, 2006).

### **III.A.2.a. La morphogenèse du squelette cranio-facial**

La morphogenèse du squelette est un processus complexe géré par de multiples morphogènes (Karsenty, 2008 ; Olsen et coll., 2000 ; Santagati et Rijli, 2003). Elle commence par la convergence et la condensation de cellules mésenchymateuses pour chacun de ses futurs éléments. La spécificité des cellules mésenchymateuses est sous le contrôle de facteurs dits «morphogènes». Ces morphogènes vont déterminer la position, la forme et la structure de l'os à venir. L'absence ou l'altération de ces signalisations a pour conséquence une anomalie plus ou moins étendue de la forme générale du squelette comme l'absence (aplasie), la malformation (hypoplasie/hyperplasie) ou l'apparition ectopique d'un ou plusieurs éléments squelettiques.

Au niveau transcriptionnel, la morphogenèse des condensations mésenchymateuses est contrôlée par des homéogènes, notamment ceux des sous-familles Hox, Pax, Bapx, Lhx, Dlx ou encore Msx. Ainsi les gènes Dlx1, Dlx2, Dlx5, Msx1, Msx2, Cart1, Pax3, Pax9 ou encore Barx1 sont impliqués lors de la morphogenèse du squelette cranio-facial. D'autres gènes (Twist, AP-2 et Mf1), des membres de la famille Hedgehog et Wnt, et des facteurs de croissance tels que les protéines morphogénétiques osseuses (BMP) ou encore les facteurs de croissance fibroblastiques (FGF) participent également à ce processus.

La morphogenèse du squelette nécessitant des processus contrôlés de protéolyse au sein des matrices extracellulaires, des membres de la famille des métalloprotéases (MMP) et leurs inhibiteurs (TIMP) sont également impliqués.

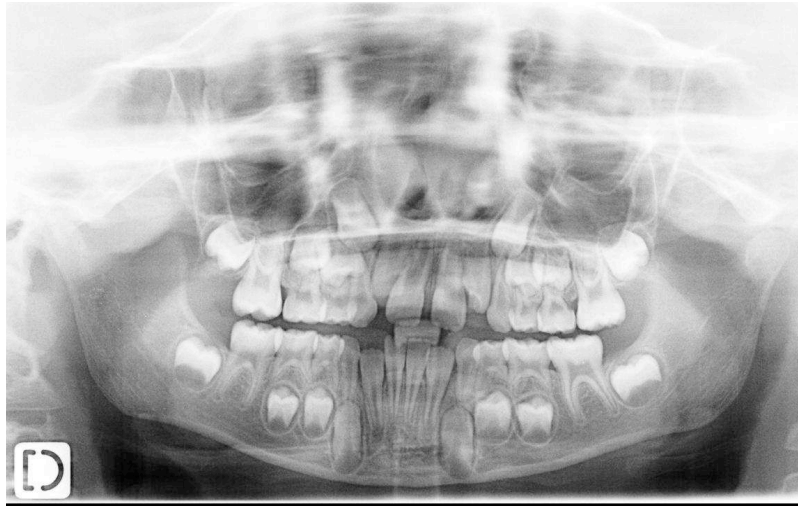
### **III.A.3. Le développement dentaire**

Le développement dentaire commence dès la 6<sup>e</sup> semaine intra-utérine chez l'humain et résulte d'une suite d'interactions épithélio-mésenchymateuses (pour revue, Cobourne et Sharpe, 2010) entre l'épithélium (épithélium dentaire) dérivé de l'ectoderme et un mésenchyme dérivé des crêtes neurales céphaliques, elles-mêmes d'origine ectodermique (l'ectomésenchyme dentaire) (*Figure 17*). Il peut être divisé en deux phases : la morphogenèse précoce et la morphogenèse tardive.

**La morphogenèse précoce** correspond à la mise en place de l'ébauche dentaire suivant plusieurs étapes morphologiques qui sont le siège d'interactions épithélio-mésenchymateuses dont les déterminants moléculaires sont progressivement connus.

**La morphogenèse tardive** correspond à l'histogenèse et à la minéralisation des tissus dentaires.

Ces deux phases ne sont pas séparées dans le temps, mais se chevauchent, la minéralisation étant initiée avant la fin de la morphogenèse précoce. Cependant, il est fréquent (chez le rongeur) d'associer la morphogenèse précoce aux étapes initiales et anténatales du développement dentaire et la formation des tissus minéralisés (biominéralisation) aux étapes tardives et postnatales.



**Figure 17. Développement de la dentition humaine (enfant de 6 ans)** (De la Dure-Molla M., Centre de Référence des "Malformations rares de la face et de la cavité buccale", Site Rothschild)

### **III.A.3.a. Etapes embryonnaires du développement dentaire**

#### **III.A.3.a.1. La morphogenèse précoce**

Les étapes de la morphogénèse précoce ont été établies depuis longtemps et ceci a fait du développement dentaire précoce un modèle pour l'étude des interactions épithélio-mésenchymateuses. Ce modèle a été beaucoup utilisé en biologie du développement.

Les facteurs de croissance des familles BMP (Bone Morphogenetic Protein, Chen et coll., 2004), Hh (Hedgehog), FGF (Fibroblast Growth Factor) et Wnt (Wint) sont les éléments diffusibles clés des voies de signalisation intervenant en relais avec des facteurs de transcription, notamment ceux codés par des homéogènes divergents de plusieurs familles (Msx, Dlx, Otx, Pax, Barx,...).

Ces voies de signalisation participent aux interactions épithélio-mésenchymateuses sous-jacentes au développement dentaire mais aussi à l'organisation anatomique des tissus dentaires en intervenant au niveau de centres organisateurs (noeuds de l'émail primaire et secondaire) (Cho et coll., 2007).

#### **III.A.3.a.2. Initiation du développement dentaire**

Chez l'embryon de souris, le développement des molaires commence au jour embryonnaire 10,5 (E10.5). Des cellules des crêtes neurales migrent au sein des bourgeons maxillaires formés, faisant face à un épaissement de l'épithélium buccal qui forme la lame dentaire.

L'analyse des schémas d'expression des facteurs de transcription (principalement les homéogènes divergents) et des facteurs de croissance (BMP, FGF, Hh, Wnt) a permis de montrer la fonction de certains d'entre eux dans le déterminisme de ce champ.



Ainsi, l'ensemble des cellules épithéliales de la lame dentaire expriment Pitx2 (Otlx, Rieg) et les facteurs de croissance Sonic hedgehog (SHH) et FGF8 (pour revue, Jernvall et Thesleff, 2000). L'expression d'autres facteurs de transcription est aussi détectée localement au sein de la lame dentaire, comme Msx2 et Dlx2 (Tummers et Thesleff, 2009), ainsi que des facteurs de croissance tels que BMP4 (Chen et coll., 2004).

Les cellules mésenchymateuses dérivées des crêtes neurales céphaliques expriment notamment les facteurs de transcription Msx1, Msx2, Dlx1, Dlx2, Barx1, Pax9, Gli1, Gli2, Gli3, Lhx6 et Lhx7 ainsi que les facteurs de croissance BMP2 et BMP4.

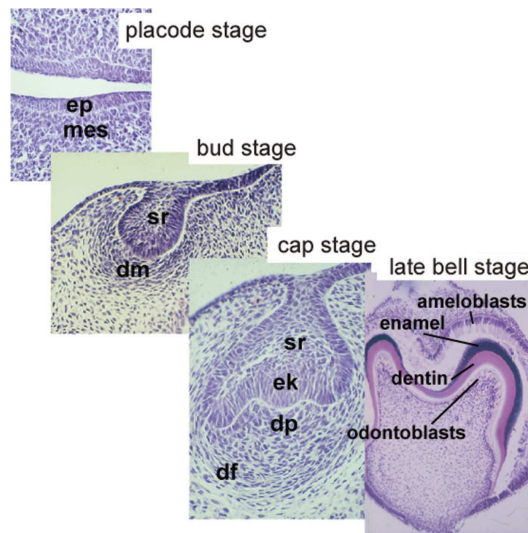
Les homéogènes, par la combinatoire de leurs schémas d'expression pourraient définir au sein des maxillaires les champs morphogénétiques dentaires.

Cette combinaison constitue ce que Paul Sharpe (Cobourne et Sharpe, 2010) a nommé, par analogie au code HOX, "l'homéocode dentaire". Ce code ne se limiterait pas uniquement au déterminisme des champs morphogénétiques dentaires (lames dentaires) mais interviendrait aussi dans le déterminisme des autres champs morphogénétiques dentaires au sein de la lame dentaire, délimitant ainsi les régions propres à chaque type dentaire (Cobourne et Sharpe, 2010).

### III.A.3.a.3. Les différents stades anté-nataux

Le développement dentaire anté-natal, après l'initiation, est divisé en trois stades morphologiques. Ces trois stades sont caractérisés par le rôle permanent des interactions épithélio-mésenchymateuses (pour revue, Cobourne et Sharpe, 2010) (Figure 18).

Les facteurs de croissance et les facteurs de transcription intervenant dans ces interactions sont cités à chaque stade.



**Figure 18.** Le développement dentaire. **Placode stage** : lame dentaire ; **Bud stage** : bourgeon ; **cap stage** : cupule ; **late bell stage** : cloche ; **ep** : épithélium ; **mes** : mésenchyme ; **sr** : reticulum étoilé ; **dm** : mésenchyme dentaire ; **dp** : papille dentaire ; **df** : follicule dentaire ; **ek** : noeud de l'émail ; **ameloblasts** : améloblastes ; **enamel** : émail ; **dentin** : dentine ; **odontoblasts** : odontoblastes (modifié d'après Thesleff et Tummers, 2009).

### *\*Le bourgeon (bud stage)*

Au stade du bourgeon (E13.5 chez la souris), l'épithélium buccal constituant la lame dentaire s'invagine dans le mésenchyme sous-jacent, formant un bourgeonnement épithélial au sein du mésenchyme. Le germe dentaire est constitué d'une partie épithéliale, dérivant de la lame dentaire. Elle induit par la suite la prolifération des cellules mésenchymateuses sous-jacentes qui se rassemblent au centre du bourgeon pour former la papille mésenchymateuse.

### *\*La cupule (cap stage)*

Le stade de la cupule (E14.5) se caractérise par la poursuite de l'invagination de l'épithélium dentaire (ED) avec apparition en son sein d'une couche de cellules palissadiques, correspondant à l'épithélium adamantin interne (EAI) et par la condensation du mésenchyme dentaire en regard de l'EAI, avec la formation progressive de la papille mésenchymateuse (PM) et du sac folliculaire (SF) (Thesleff et Tummers, 2009). A ce stade, il apparaît dans la partie centrale de l'EAI un pool de cellules concentriques appelé noeud de l'émail (NE) qui constitue un centre organisateur du germe dentaire (Thesleff et Tummers, 2009).

Ce centre de signalisation exprime les facteurs de transcription Msx2 et Lef1 ainsi que P21. Il sécrète les facteurs de croissance des quatre familles.

Dans le mésenchyme, tandis que l'expression de l'homéogène Msx2 se modifie et celles des facteurs de transcription Lef1 et Runx2 commencent, les facteurs de croissance des familles BMP et FGF ainsi que l'Activine A sont sécrétés par ces cellules.

### *\*La cloche (late bell stage)*

Au stade de la cloche (E16.5), la cytodifférenciation commencée au stade de la cupule, va s'accroître. Dans l'épithélium dentaire, quatre couches cellulaires sont identifiables : l'épithélium adamantin externe (EAE) entourant une masse de cellules étoilées, le réticulum étoilé (RE) et une couche de cellules cubiques, le stratum intermédiaire (SI), séparant le RE de l'EAI. Les zones de réflexion (ZR) qui sont à l'origine des quatre couches de cellules, sont des zones de progression formées de cellules indifférenciées. Dans le mésenchyme dentaire, deux zones tissulaires sont reconnaissables : la papille mésenchymateuse (PM) se trouvant face à l'EAI est formée d'une masse dense de cellules indifférenciées et le sac folliculaire (SF) entourant l'ensemble formé par l'épithélium dentaire et la papille mésenchymateuse et comprenant des cellules allongées et orientées circonférentiellement.

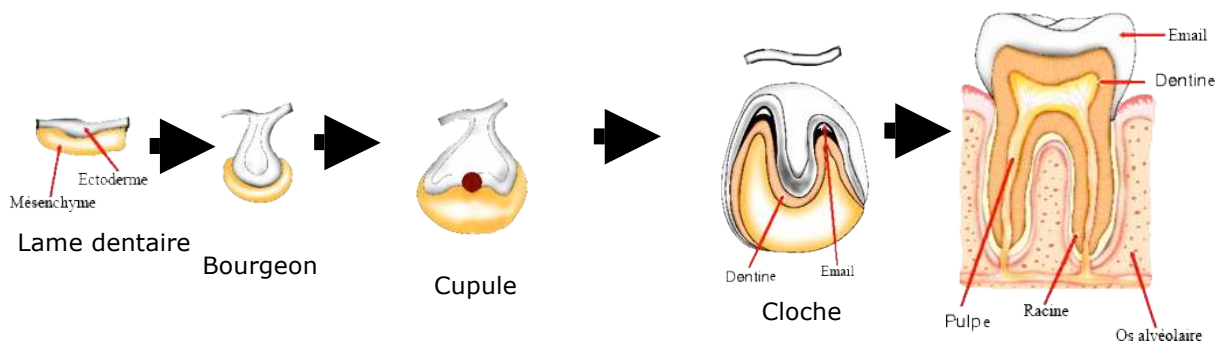
Dans l'EAI, comme dans la couche périphérique de la papille dentaire en regard de l'EAI, un gradient de cytodifférenciation suivant la progression des zones de réflexion va aboutir à la différenciation fonctionnelle des améloblastes et des odontoblastes, formant l'émail et la dentine.

D'autre part, dans l'EAI, les noeuds secondaires de l'émail, situés dans les régions des futures cuspidés, sont des centres organisateurs de la morphogénèse dentaire tardive (pour revue, Jernvall et Thesleff, 2000 ; Thesleff et Tummers, 2009). Ils expriment et sécrètent les mêmes facteurs que le noeud de l'émail primaire, par contre, ils n'interviennent pas sur la prolifération mais sur la différenciation cellulaire.

Dans les cellules de la papille mésenchymateuse, l'expression des facteurs de transcription observée au stade précédent est maintenue et complétée par l'expression de Dlx3 (Ghoul-Mazgar et coll., 2005).

Des facteurs de croissance des familles BMP, FGF et Wnt sont aussi sécrétés par les cellules de la papille mésenchymateuse.

Après l'achèvement de la forme coronaire, l'épithélium dentaire poursuit son invagination sous la forme de la gaine de Hertwig comprenant uniquement deux couches cellulaires peu différenciées. Si en regard de cet épithélium, la cytodifférenciation des cellules de la papille mésenchymateuse reste identique, l'épithélium va, quant à lui, progressivement se disloquer, permettant l'organisation du parodonte à partir du sac folliculaire (Zeichner-David et coll., 2003) (Figure 19).



**Figure 19. Morphogénèse précoce et morphogénèse tardive (Thesleff, 2002)**

#### **III.A.3.a.4. Histogénèse et minéralisation**

La morphogénèse tardive des tissus minéralisés dentaires correspond à un stade terminal où l'émail et la dentine ont été déposés au cours des processus respectifs de l'amélogénèse et de la dentinogénèse.

La morphogénèse terminale repose sur un équilibre dynamique dans l'espace et dans le temps, établi entre les événements cellulaires (prolifération, différenciation et apoptose) et les événements extracellulaires (sécrétion et minéralisation).

La morphogénèse terminale, spécifique de chaque type de dent, est le plus souvent attribuée aux améloblastes qui formeront la partie visible de l'organe dentaire. Cependant, il est clair que dans la partie interne de la dent, les odontoblastes sont aussi impliqués durant cette morphogénèse, ne serait-ce que par leur rôle dans l'activation des préaméloblastes en préaméloblastes sécréteurs (Thesleff et Tummers, 2009).

### **III.A.3.b. L'amélogénèse (Figure 20)**

#### **III.A.3.b.1. La présécrétion**

Au stade de présécrétion débutant, les cellules de l'épithélium donne les quatre couches précédemment rapportées. L'épithélium adamantin interne est composé d'une rangée de cellules, les futurs améloblastes, séparés des odontoblastes par une membrane basale qui sera détruite peu de temps avant la sécrétion active de l'émail. Ces cellules sortent du cycle mitotique pour donner les améloblastes présécréteurs. Leur morphologie se modifie avec l'allongement du corps cellulaire et l'organisation d'une polarité structurale et fonctionnelle de sécrétion de protéine extracellulaire.

L'améloblaste présécréteur présente à son extrémité apicale une série de petits prolongements qui entrent en contact avec la prédentine par destruction de la membrane basale en deux étapes : fragmentation et phagocytose. A ce stade, l'épithélium joue un rôle inducteur dans le déclenchement de la différenciation terminale des odontoblastes (Pour revue, Bei, 2009)

La réexpression transitoire dans l'épithélium de nombreux gènes impliqués dans les interactions épithélio-mésenchymateuses de la morphogénèse initiale, comme ceux codant les facteurs de croissance, serait un élément de cette induction (Pour revue, Bei, 2009).

D'autre part, à ce stade, l'expression de quelques protéines impliquées dans la biominéralisation, telles que la phosphatase alcaline (Hotton et coll., 1999), la tuftéline (Zeichner-David et coll., 1995) a été détectée dans les améloblastes présécréteurs. C'est aussi à ce stade que certaines protéines dentinaires ainsi que leurs transcrits ont été visualisés dans les améloblastes présécréteurs DSP (Ritchie et coll., 1997) et inversement des protéines amélares et leurs transcrits dans les améloblastes et leurs transcrits dans les odontoblastes, amélogénine (Papagerakis et coll., 2003), améline (Fong et coll., 1998).

#### **III.A.3.b.2. La sécrétion**

L'améloblaste sécréteur est une cellule très allongée qui présente un noyau ovalaire en position proximale et un appareil sécrétoire médian et distal très développé.

L'améloblaste sécréteur mature qui a atteint sa taille maximale est capable de sécréter la matrice extracellulaire. Son pôle sécrétoire est initialement plat, donnant naissance à une première couche d'émail aprismatique interne. A la suite de cette élaboration, le pôle apical se transforme. Il présente une formation allongée à son pôle distal, le prolongement de Tomes, dont la structure et l'activité déterminent l'organisation de l'émail en zones prismatiques et interprismatiques.

Les améloblastes en fin de sécrétion, et dont la hauteur commence à se réduire, élaborent la dernière couche d'émail qui présente une organisation similaire à celle de l'émail aprismatique interne. Cette couche est appelée émail prismatique externe.

La synthèse des protéines matricielles est maximale pendant la sécrétion (Simmer et coll., 2010). Les précurseurs de la matrice synthétisés et secrétés par les améloblastes auraient des fonctions diverses et complémentaires dans la minéralisation comme le suggèrent des approches morphologiques en microscopie électronique qui lient leur organisation au sein de la matrice et le contrôle spatial de la minéralisation.

La mise en évidence d'une relation étroite entre la quantité d'amélogénine synthétisée et l'épaisseur de l'émail (Snead et coll., 1985) valide le rôle morpho-effecteur direct que jouent ces protéines matricielles dans la morphogénèse tardive (la minéralisation). Au sein de la matrice, l'énaméline constituerait l'environnement immédiat du cristal alors que les amélogénines (90% des protéines de l'émail) seraient extra-cristallines et labiles. Ces deux protéines sont capables de contrôler la croissance de l'hydroxyapatite *in vitro*. Néanmoins, les mécanismes intimes de la nucléation ou des nucléations et de la croissance cristalline sont encore mal connus, mal définis bien qu'elles semblent répondre à une organisation architecturale très précise. L'améloblastine (ou améline ou sheathline) aurait de par sa distribution très particulière dans l'émail prismatique, un rôle déterminant dans l'organisation supra-cristalline en prisme de l'émail (Simmer et coll., 2010).

D'autre part, le flux de calcium, de sérum vers la matrice, est contrôlé au stade de sécrétion par les cellules améloblastiques. Une forte expression des protéines impliquées dans le transport du calcium est présente comme celles de la Ca ATPase (Hubbard, 2000) et de la calbindine -D<sub>28k</sub> (Berdal et coll., 1991 ; 1993), mais cette expression diminue par palier le long de la sécrétion et plus clairement à l'approche du stade de transition. L'expression de la phosphatase alcaline est presque nulle au stade de sécrétion dans les améloblastes (Hotton et coll., 1999). L'émail produit par les améloblastes sécrétoires est immature. Il comporte approximativement 70% de matrice organique et d'eau et 30% de minéral.

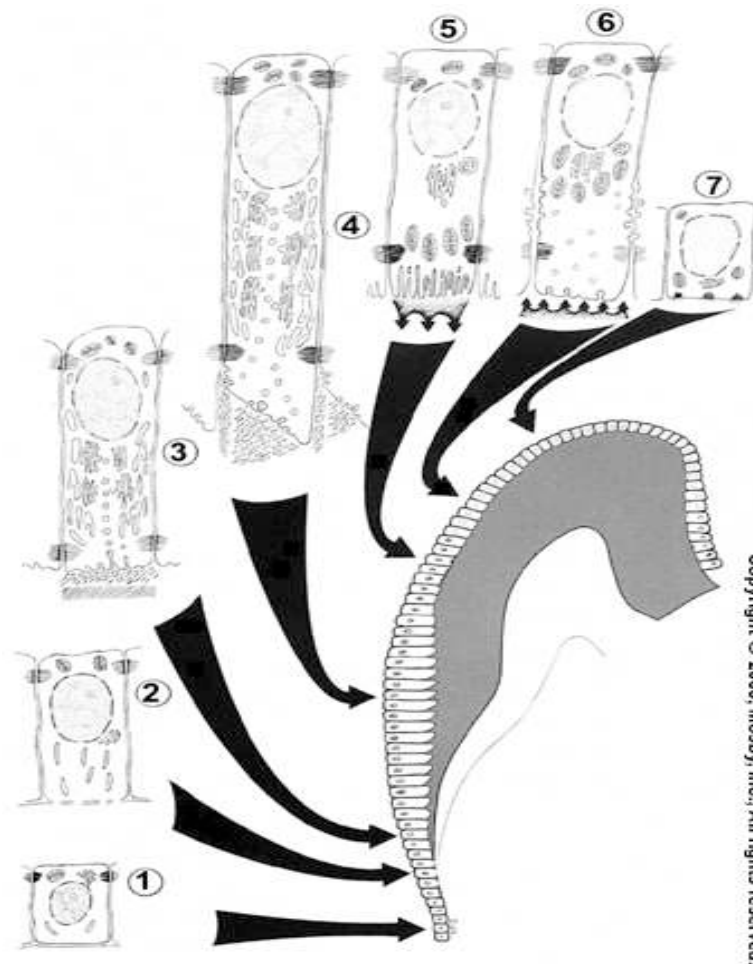
#### **III.A.3.b.3. La transition**

Au stade de transition, les améloblastes perdent leur aspect de cellules sécrétoires de la matrice de l'émail. Ce stade se caractérise par la disparition de 25% des améloblastes (Hubbard, 2000 ; Hoenderop et coll., 2005). Pendant la transition, la synthèse protéique comme le transport de calcium semblent marquer une pause (Lacruz et coll., 2010). De plus, les améloblastes de transition mettent en place une membrane basale qui les sépare de l'émail en minéralisation tout au long de la maturation (Lyaruu et coll., 2008). A ce moment là, leur hauteur diminue.

#### **III.A.3.b.4. La maturation**

Au stade de maturation, les améloblastes subissent une transformation cyclique, passant d'une forme avec bordure apicale plissée à une forme avec une bordure lisse. L'activité cellulaire est plus importante dans les cellules à bordure plissée, c'est à leur niveau que s'observent les activités de réabsorption matricielle (Paine et

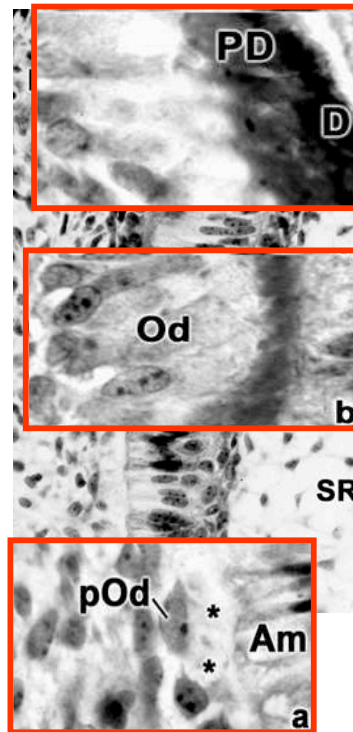
Snead, 2005) et de transport actif du calcium qui vont aboutir à la formation d'un émail minéralisé à près de 96% et contenant quelques protéines résiduelles (pour revue, Bei, 2009). La synthèse globale semble faible, néanmoins les améloblastes de maturation à bordure plissée se caractérisent par une forte expression des protéines impliquées dans la biominéralisation : la Ca ATPase (Hubbard, 2000), la phosphatase alcaline (Hotton et coll., 1999), la calbindine-D<sub>9k</sub> et la calbindine-D<sub>28k</sub> (Berdal et coll., 1991 ; 1996 ; Hotton et coll., 1995) et les enzymes de dégradation protéique (Simmer et coll., 2010).



**Figure 20. L'amélogénèse** (Nanci, 2003 ; Ten Cate's, Oral Histology, St. Louis, Mosby)

**1. Cellules indifférenciées ; 2. Présécrétion :** Sortie du cycle mitotique, différenciation, Première expression des protéines de la minéralisation, Interactions avec les pré-odontoblastes ; **3, 4. Sécrétion :** Acquisition prolongement de Tomes, Synthèse matricielle maximale ; **5, 6,7. Maturation :** Apoptose, Dégradation matricielle, Biominéralisation

### III.A.3.c. La dentinogénèse (Figure 21)



**Figure 21. La dentinogénèse** (Cours Descroix, 2007, Université Paris-Diderot)

**Présécrétion (a)** : préODontoblastes (pOd) : Prolifération et Différenciation terminale des améloblastes (Am), SR : Réticulum étoilé ; **Sécrétion et maturation (b)** : Odontoblastes (Od) : Polarisation, allongement du corps cellulaire, Synthèse matricielle des collagènes et des protéines non collagéniques ; **Biominéralisation (c)** : Pd : prédentine, D : dentine

#### III.A.3.c.1. La présécrétion

Au stade de présécrétion, suite à l'induction par les préaméloblastes, les préodontoblastes prolifèrent. Ces cellules faiblement polarisées à la jonction épithélio-mésenchymateuse formant une palissade, se différencient en odontoblastes post-mitotiques. A ce stade, les odontoblastes induisent et contrôlent à leur tour la différenciation terminale des améloblastes. La surexpression des facteurs de croissance TGF $\beta$ , BMPs (Oka et coll, 2007 ; Gao et coll., 2009) dans les odontoblastes semble impliquée dans ces phénomènes d'induction aussi bien que dans la différenciation terminale des odontoblastes. Certaines protéines matricielles comme la fibronectine synthétisée par les odontoblastes, jouent un rôle aussi important dans la différenciation terminale de ces cellules (Gao et coll., 2009).

#### III.A.3.c.2. La sécrétion

Au stade de sécrétion, les odontoblastes vont progressivement se polariser, s'allonger, laissant un prolongement cellulaire dans la matrice dentinaire, au fur et à mesure de sa formation, alors que le corps cellulaire incluant les principaux organites va rester en bordure de la dentine (Suzuki et coll., 2009). Les principales protéines matricielles exprimées dans les odontoblastes à ce stade, correspondent à des protéines

d'abord isolées dans le tissu osseux, en premier lieu le collagène de type I, l'ostéocalcine, l'ostéonectine, la sialoprotéine osseuse, ainsi que les protéoglycanes (Butler et coll., 2003)

Certaines protéines de la matrice dentinaire sont aussi exprimées, la sialoprotéine dentinaire, la phosphoprotéine dentinaire, la protéine matricielle dentinaire 1 (DMP1) (Arana-Chavez et coll., 2004). Les odontoblastes comme les améloblastes contrôlent en partie le transport du calcium du sérum à la matrice (Hubbard, 2000). Ces cellules expriment des molécules impliquées dans la biominéralisation comme la phosphatase alcaline (Hotton et coll., 1999), la calbindine-D<sub>28k</sub>, (Berdal et coll., 1996), les canaux ioniques et la Ca-ATPase (Hubbard, 2000 ; Lundquist et coll., 2000).

Contrairement à l'amélogénèse au cours de laquelle la sécrétion matricielle et la minéralisation de cette matrice sont partiellement découplées dans le temps (Robinson, 1998), ces deux processus sont concomitants au cours de la dentinogénèse (Lundquist et coll., 2000).

L'apposition et la minéralisation de la matrice ont lieu de façon continue suivant un processus complexe (Hao et coll., 2009). Cependant, il est nécessaire de préciser l'existence d'une zone tampon entre l'odontoblaste et le front de minéralisation que l'on nomme prédentine. Cette zone de taille constante durant la sécrétion est totalement traversée par les prolongements cellulaires des odontoblastes

#### **IV - LES PROTEINES DE LA MATRICE EXTRACELLULAIRE**

##### **IV.A. Rôles des protéines de la matrice extracellulaire dans la biominéralisation**

La biominéralisation chez l'homme et chez les vertébrés en général, est un processus contrôlé par la matrice organique (Lowenstamm, 1981 ; Kawasaki et coll., 2009). Les propriétés spécifiques des tissus minéralisés, à savoir, l'émail, la dentine et l'os, résultent de la composition unique de leur matrice extracellulaire (MEC). Les protéines matricielles guident le processus de différenciation, d'activation cellulaire et de minéralisation. La phase organique de l'os, de la dentine et du ciment est essentiellement composée de collagène du type I. Elle contient de surcroît des protéoglycanes et des protéines anioniques non collagéniques, qui joueraient un rôle important dans le processus de minéralisation (Sommer et coll., 1996). L'émail, dépourvu de collagène, est composé de différentes protéines, l'amélogénine, l'améloblastine et l'énaméline. Ces protéines extracellulaires forment un échafaudage pour les sites qui comportent des sites de nucléation et de croissance du cristal. Les sites sont des « enveloppes » glyco-lipo-protéiques différentes suivant le tissu. On peut citer les espaces périodiques des collagènes, les vésicules matricielles de l'os primaire et du cartilage ou les nanosphères auto-assemblées en structures tubulaires de l'émail. Ces microenvironnements guident les ions calcium et phosphates vers leur intégration dans une phase cristalline (Wang et coll., 1998 ; Gollub et coll., 2009).

Les protéines non collagéniques de la MEC interviennent dans le processus de biominéralisation. La séquence matricielle est schématisée en trois étapes qui accompagnent les transformations cristallines. La première

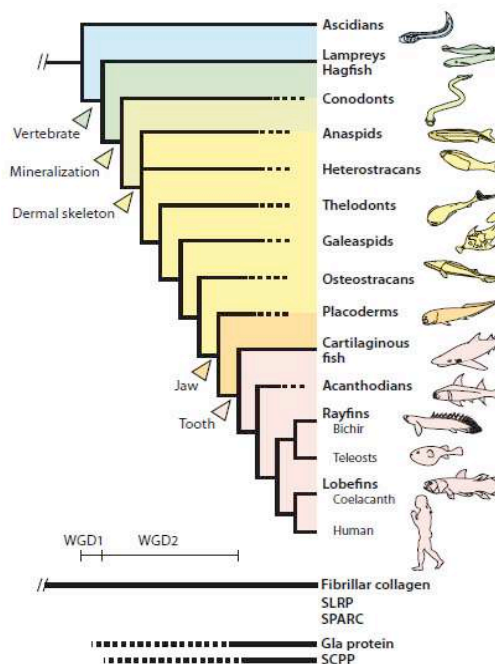


concerne l'adsorption des ions à la matrice protéique, ce qui modifiera ses propriétés mécaniques et structurales. La deuxième étape est la nucléation des particules de taille nanométrique sur un sous-groupe de protéines (nucléation qualifiée d'hétérogène par la multiplicité de ces sites initiaux). La troisième étape est la croissance micrométrique de ces particules par apport ionique et/ou par agrégation. Ces formes immatures de minéral seront transformées en cristaux d'apatites (Ba et coll., 2010). Les protéines de la MEC contrôlent chacun de ces événements.

Ainsi, les glycoaminoglycannes chargés négativement, l'acide  $\gamma$ -carboxyglutamique (Gla) et d'autres acides aminés acides (Glu, asp, et phospho-Ser) séquestrent et/ou chélatent des ions calcium disponibles pour la cristallisation de l'hydroxyapatite et inhibent la minéralisation (Boskey, 1997). L'adsorption de ces molécules acides de la matrice extracellulaire sur une face du cristal peut bloquer l'apport des ions sur cette face et influencer la forme du cristal (Fujisawa, 1991). Au contraire, si l'interaction stabilise le noyau du cristal initial, ces molécules peuvent faciliter la minéralisation (Boskey, 1997).

Les polypeptides des fibrilles de collagène forment des triples hélices caractéristiques qui s'assemblent à leur tour dans les fibrilles de collagène. Dans ce processus, plusieurs protéoglycannes et protéines de la matrice extracellulaire facilitent la fibrillogénèse qui peut intervenir sur la minéralisation des fibrilles de collagène (Wiesmann, 2005).

L'analyse comparative des tissus minéralisés, de la séquence et du nombre de gènes codant pour les protéines de la matrice extracellulaire, a permis de retracer certains de leurs aspects fonctionnels. Une grande conservation de leur structure a été retracée dans l'évolution (Figure 22).



**Figure 22.** La phylogénie vertébrée et l'évolution de la minéralisation squelettique. Les vertébrés éteints sont en lignes pointillées. Les gènes des collagènes, de SLRP et de SPARC se sont exprimés après la divergence des lignées ascidiennes et vertébrées.

#### IV.A.1. Les collagènes

Chez l'homme, le collagène de type I est la protéine la plus abondante de l'organisme, largement exprimée dans la plupart des tissus. Les fibres de collagène de type II et XI forment le cadre du cartilage (Eyre, 2002). Pendant la minéralisation précoce du cartilage, de l'os, de la dentine et du ciment, les premiers cristaux d'hydroxyapatite formés dans les vésicules matricielles génèrent par fusion une matrice composée de fibrilles de collagène minéralisé. Dans l'os et la dentine, les collagènes de type I et de type V constituent la matrice organique (90%) et forment la charpente de ces tissus (Von der Mark, 2006). Les molécules de collagène s'organisent en un réseau tridimensionnel de fibres de gros diamètre. Ce motif architectural est spécialement adapté pour la minéralisation.

Sur le plan moléculaire, Les collagènes sont des tri-peptides formés de chaînes de structure spécifiques à chaque type. Les chaînes alpha des collagènes de type II et III sont codées par un seul gène tandis que les chaînes alpha collagènes de type I, V et XI sont codées par deux ou trois gènes distincts (*Tableau 1*).

Deux nouveaux types de collagène le type-XXIV et le type-XXVII (avec une seule chaîne codée par un gène) ont été récemment identifiés dans l'os et le cartilage. Ces nouveaux collagènes ne semblent pas former des hétérofibrilles avec le type I ou le type II dans ces tissus (Hjorten et coll., 2007 ; Matsuo et coll., 2007 ; Plumb et coll., 2007).

Type	Gene symbol	Gene name	Chromosomal location
I	COL1A1	Collagen, type I, $\alpha$ 1	17q21.33
I	COL1A2	Collagen, type I, $\alpha$ 2	7q21.3
II	COL2A1	Collagen, type II, $\alpha$ 1	12q13.11
III	COL3A1	Collagen, type III, $\alpha$ 1	2q32.2
V	COL5A1	Collagen, type V, $\alpha$ 1	9q34.3
V	COL5A2	Collagen, type V, $\alpha$ 2	2q32.2
V	COL5A3	Collagen, type V, $\alpha$ 3	19p13.2
XI	COL11A1	Collagen, type XI, $\alpha$ 1	1p21.1
XI	COL11A2	Collagen, type XI, $\alpha$ 2	6p21.32
XXIV	COL24A1	Collagen, type XXIV, $\alpha$ 1	1p22.3
XXVII	COL27A1	Collagen, type XXVII, $\alpha$ 1	9q32

**Tableau 1.** Les différentes chaînes dans les familles de collagènes (*Kawasaki et coll., 2009*)

#### IV.A.2. Les protéoglycanes [The small leucine-rich repeat proteoglycan (SLRP) family]

Les protéoglycanes (PG) (*Tableau 2*) sont formés de protéines associées à des glycosaminoglycanes (GAG) sulfatés de type chondroïtine-sulfate, dermatane-sulfate et kératane-sulfate (Lamoureux et coll., 2007).

Les groupes - sulfate et carboxylique - des GAG chargés négativement attirent les ions calcium qui sont chargés positivement.

Les protéoglycane présents dans la dentine sont la décorine et le biglycan (Emberly et coll., 2001 ; Waddington et coll., 2003). La fibromoduline, le lumican (Hall et coll., 1997) et le versican (Takagi et coll., 1990), l'asporine (Henry et coll., 2001 ; Lorenzo et coll., 2001), le kératocan (Corpuz et coll., 1996) et l'ostéoadhérine (Buchaille et coll., 2000 ; Petersson et coll., 2003) sont présentes dans l'os, la dentine et le cément.

Class	Gene symbol	Gene name	Chromosomal location
I	BGN	Biglycan	Xq28
I	DCN	Decorin	12q21.33
I	ASPN	Asporin	9q22.31
II	FMOD	Fibromodulin	1q32.1
II	PRELP	Proline/arginine-rich end leucine-rich repeat protein	1q32.1
II	LUM	Lumican	12q21.33
II	KERA	Keratocan	12q21.33
II	OMD	Osteomodulin	9q22.31
III	OPTC	Opucin	1q32.1
III	EPYC	Epiphycan	12q21.33
III	OGN	Osteoglycin	9q22.31
ECM2	ECM2	Extracellular matrix protein 2	9q22.31

**Tableau 2. Les protéoglycane (PG) (Kawasaki et coll., 2009)**

Le rôle des protéoglycane (PG) dans les phénomènes de biominéralisation est mal défini. Il a été suggéré que la décorine, le lumican et l'ostéoadhérine puissent avoir un rôle dans la mise en place du réseau des fibres de collagène. L'ostéoadhérine aurait également une autre fonction, celle de nucléateur lors de la biominéralisation (Scott, 1988 ; Birk et coll., 1995 ; Buchaille et coll., 2000 ; Emberly et coll., 2001 ; Petersson et coll., 2003). En solution, le biglycane lui-même a été décrit comme étant nucléateur des cristaux d'hydroxyapatite et à de plus fortes concentrations, inhibiteur de la croissance des cristaux (Boskey et coll., 1997).

Dans tous les cas, la fonction des PG dans la biomérialisation pourrait être expliquée au moins en partie par leur structure intrinsèque. En effet, les chaînes glycosaminoglycane contiennent plusieurs groupements sulfates et carboxyles qui confèrent aux PG une capacité importante à fixer le calcium.

Des études ont montré que beaucoup d'autres PG sont également impliqués dans la formation de l'os et de la dentine et de certains tissus mous. Parmi ceux-ci, on peut citer le perlecan et le glypican 3 (GPC3) et le 1-4 syndecan (SDC1-4) (Lamoureux et coll., 2007).

#### **IV.A.3. Les protéines à groupements gamma carboxy-glutamiques ou Gla-protéines**

Une Gla-protéine est une protéine qui comporte une modification enzymatique d'un résidu d'acide glutamique (Fury et coll., 1999).

Le résidu acide d'une Gla-protéine a une affinité élevée pour l'hydroxyapatite, et semble réguler la morphologie de l'hydroxyapatite et la croissance du cristal (Hoang et coll., 2003).

La Gla-protéine de l'os (BGP, Bone Gla-Protein : Ostéocalcine) et la Gla-protéine de la matrice (MGP : Matrix Gla-Protein) sont les deux Gla-protéines exprimées dans l'os, la dentine et le ciment (Hauschka et coll., 1989).

La BGP est exprimée dans les chondrocytes hypertrophiques, les ostéoblastes matures, les odontoblastes, et les cémentoblastes.

Pendant la formation de l'os, l'expression de la BGP est régulée positivement pendant la différenciation et par conséquent la BGP semble être importante pour la maturation de l'os (Zhu et coll., 2008). En revanche, l'expression de MGP est forte dans les chondrocytes prolifératifs et hypertrophiques et dans divers tissus mous, mais n'est pas significative dans les chondrocytes, les ostéoblastes ou les odontoblastes (Luo et coll., 1995 ; Newmann et coll., 2001). Il a été prouvé que MGP agit directement avec la Bone Morphogénétique Protéine-2 (BMP2) et inversement. Ainsi elle empêche l'activité inductive de la chondrogenèse et de l'ostéogenèse par BMP2 (Gundberg et coll., 2006).

#### **IV.A.4. SPARC et SPARCL1 (Secreted Protein Acidic and Rich in Cystein)**

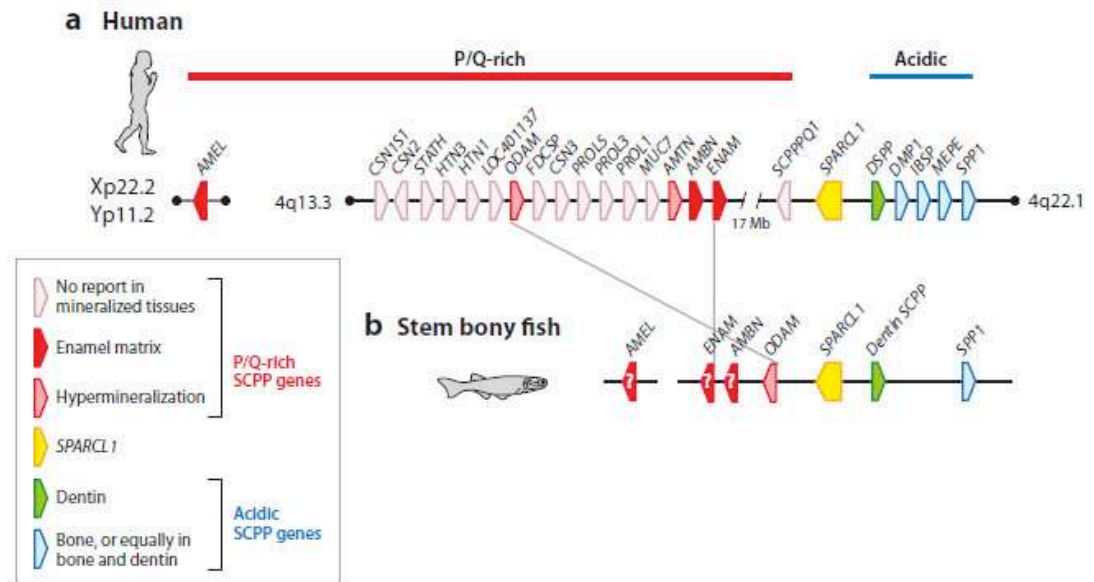
La SPARC (Ostéonectine) est une protéine non collagénique abondante dans les tissus minéralisés collagéniques (Termine et coll., 1981). C'est une glycoprotéine importante dans l'os et dans les dents (Papagerakis et coll., 2002) où elle est associée aux surfaces des cristaux d'apatite. Elle est composée d'un peptide signal doté de trois domaines fonctionnels (Brekken et Sage., 2001). Le domaine N-terminal de SPARC s'associe aux ions de calcium par les acides aminés. SPARC est également lié aux collagènes et régule leur fibrillogenèse (Martinek et coll., 2007 ; Rentz et coll., 2007).

L'association de SPARC avec différents facteurs de croissance (comme le VEGF) peut inhiber leurs activités (Clarke et Sage., 2008).

La protéine SPARCL1 est étroitement liée à SPARC et est également impliquée dans la fibrillogenèse du collagène (Termine et coll., 1981). Toutefois, SPARCL1 est exprimée principalement dans les tissus d'origine neurale plutôt que dans les tissus squelettiques (Mothe et Brown, 2001).

#### **IV.A.5. La famille des S CPP (Secretory Calcium binding PhosphoProtein)**

À la différence des autres familles de protéine décrites ci-dessus, la famille de S CPP est aussi bien impliquée dans la formation des tissus minéralisés collagéniques comme l'os et la dentine que dans la formation de l'émail, tissu minéralisé non collagénique (Kawasaki et Weiss, 2003 ; 2008) (Figure 23).



**Figure 23.** Les familles des gènes SPARC, SPARCL1 et SCPP au cours de l'évolution. Il a été proposé que les gènes de la famille SCPP aient évolué par duplication à partir du gène ancestral SPARC. Cette apparition évolutive coïncide chez les poissons à l'apparition des squelettes osseux (Kawasaki et coll., 2009)

Les protéines de la famille SCPP (appelées aussi SIBLINGS, Small Integrin Binding Ligand N-Linked Glycoproteins) sont potentiellement associées à des ions calcium et modèleraient la cristallisation du minéral (Butler et coll., 2003 ; Holt et coll., 2009). Toutes les protéines de la famille SCPP ont une séquence Arg-Gly-Asp (RGD) qui est reconnue par une classe de récepteurs cellulaires, les intégrines. Les interactions entre matrice extracellulaire et intégrine interviennent dans la différenciation, la survie des ostéoblastes, la synthèse de la matrice et le remodelage osseux.

SPP1, IBSP, DMP1 et DSPP (la Dentin PhosphoProtéine, DPP et la Dentin SialoProtéine DSP) ont été montrées associées au collagène et impliquées dans le développement initial des fibres (Heinegard et coll., 2006 ; Sodek et coll., 2000 ; Tye et coll., 2005 ; Veis 2003).

Plusieurs membres de la famille SCPP (Tableau 3) sont importants pour la formation de l'émail. L'émail est composé de 90% de ces protéines pendant le développement de la matrice amélaire. Elles s'auto-assemblent dans une structure supramoléculaire qui guide l'organisation et la forme des cristaux d'émail (Fincham et coll., 1999 ; Margolis et coll., 2006). L'existence d'interactions fortes entre croissance cristalline et protéines de l'émail a été proposée.

Les protéines de l'émail seront présentées plus en détail dans un chapitre spécifique.

Class	Gene symbol	Gene name	Chromosomal location
None	SPARC	Secreted protein, acidic, cysteine-rich	5q33.1
None	SPARC.L1	SPARC-like 1	4q22.1
Acidic	SPP1	Secreted phosphoprotein 1	4q22.1
Acidic	MEPE	Matrix extracellular phosphoglycoprotein	4q22.1
Acidic	IBSP	Integrin-binding sialoprotein	4q22.1
Acidic	DMP1	Dentin matrix acidic phosphoprotein 1	4q22.1
Acidic	DSPP	Dentin sialophosphoprotein	4q22.1
P/Q-rich	ODAM	Odontogenic, ameloblast associated	4q13.3
P/Q-rich	AMTN	Amelotin	4q13.3
P/Q-rich	AMBN	Ameloblastin	4q13.3
P/Q-rich	ENAM	Enamelin	4q13.3
P/Q-rich	AMELX	Amelogenin	Xp22.2
P/Q-rich	AMELY	Amelogenin, Y-linked	Yp11.2

**Tableau 3. La famille des SCPP (Secretory Calcium binding PhosphoProtein) (Kawasaki et coll., 2009)**

#### **IV.A.6. La calbindine-D<sub>28k</sub>**

La calbindine-D<sub>28k</sub> est une calciprotéine (CaBp) appartenant à la superfamille des protéines à motif EF Hand. Ces protéines de liaison du calcium dériveraient d'un ancêtre commun. Leur unité structurale, évolutive et fonctionnelle est le motif EF Hand qui est composé de 36 résidus. Au cours de l'évolution, ce domaine aurait subi deux duplications successives pour donner une protéine à quatre domaines qui serait l'ancêtre de cette famille (Kawasaki et coll., 2009). Cet ancêtre aurait évolué pour générer les protéines membres de la famille des protéines à motif EF Hand. Ces protéines se regroupent en deux classes, les senseurs calciques et les tampons calciques.

La calbindine-D<sub>28k</sub> fait partie de la classe des tampons calciques (Gifford et coll., 2007) et forment avec la calbindine-D<sub>9k</sub> un sous-ensemble de calciprotéines mobiles. Plusieurs auteurs (Szebenyi et Moffat, 1986 ; Szebenyi et coll., 1981 ; Linse et Forsen, 1991) ont mis en évidence des modifications mineures au niveau de la séquence d'acides aminés qui permettent à un motif EF Hand de présenter une large gamme d'affinité pour le calcium (Gifford et coll., 2007).

La calbindine-D<sub>28k</sub> a été extraite pour la première fois dans le duodénum de poulet (Wasserman et Taylor, 1966). Elle a été localisée ensuite dans les entérocytes intestinaux (Jande et coll., 1981 ; Thorens et coll., 1982) dans certaines cellules du tube contourné distal du rein (Jande et coll., 1981 ; Taylor, 1982) et dans certains neurones de différentes parties du cerveau (Jande et coll., 1981 ; Rogers, 1987). Elle a été également localisée dans les cellules granulaires de l'hippocampe (Jande et coll., 1981), dans les cellules horizontales et apocrines de la rétine (Schreiner et coll., 1985), dans les cellules bêta du pancréas (Roth et coll., 1982), dans les chondrocytes matures et en phase de division du cartilage (Zouh et coll., 1986), dans la glande coquillière (Wasserman et coll., 1982), dans l'os (Christakos et coll., 1979 ; Berdal et coll., 1989a et b ; Balmain et coll., 1986) et dans les tissus dentaires (Berdal et coll., 1989a et b ; Berdal et coll., 1993 ; Magloire et coll., 1988). Le

cDNA humain de la calbindine-D<sub>28k</sub> a été cloné (Parmentier et coll., 1987). Il comporte un cadre de lecture ouverte qui code pour une protéine de 261 acides aminés, contenant 4 domaines de liaison au calcium actifs et 2 domaines modifiés qui ont perdu leur capacité à lier le calcium.

Sa synthèse a été montrée dépendante du système endocrinien de la vitamine D dans l'intestin, le rein et la dent (pour revue, Berdal et coll., 2011). Le premier rôle attribué à la calbindine-D<sub>28k</sub> est celui de transporteur de calcium, mais les fortes concentrations de cette même protéine dans des tissus qui ne transportent pas le calcium (comme le cerveau) et l'existence de niveaux normaux de calcium dans les souris mutées nulles pour la calbindine-D<sub>28k</sub> (Airaksinen, 1997) ont motivé l'approfondissement des études sur les fonctions de la calbindine-D<sub>28k</sub>. La fonction la plus connue de la calbindine-D<sub>28k</sub> est de faciliter le transport du calcium, dépendamment de la vitamine D, dans les cellules intestinales et rénales (Christakos, 2005).

Une autre fonction de la calbindine-D<sub>28k</sub> serait de lier le calcium, ou de le séquestrer dans un compartiment lysosomal dans le cytosol (Nemere et coll., 1986) au cours du transport calcique dans l'entérocyte

Dans le rein, la calbindine-D<sub>28k</sub> est exprimée dans les cellules principales du tubule contourné distal où s'effectue la réabsorption active, vitamine-D dépendante, du calcium. Elle agirait en accélérant la diffusion du calcium (Feher, 1988) et par une association directe avec les canaux calciques TRPV5 (pour revue, Perez, 2008).

Des mécanismes similaires pourraient se produire dans d'autres tissus, tel l'organe de l'émail, où la calbindine-D<sub>28k</sub> est exprimée en forte concentration et où les mouvements de calcium sont aussi importants. Dans les tissus minéralisés, les calbindines-D<sub>9k</sub> et <sub>28k</sub> ont été montrées présentes dans les cellules directement impliquées lors de la formation de la matrice minéralisée (améloblastes, odontoblastes, ostéoblastes et chondrocytes ; Berdal et coll., 1996 ; Magloire et coll., 1991). La quantité de calbindine-D<sub>28k</sub> est plus importante dans les améloblastes et les chondrocytes que dans les odontoblastes et les ostéoblastes.

Une dernière fonction serait la protection cellulaire contre les effets stimulateurs de fortes concentrations de calcium et son action de tampon qui limiterait la quantité des signaux de calcium dans les synapses des nerfs (Christakos., 2003). D'autres études ont montré que la calbindine-D<sub>28k</sub> a une fonction importante dans la protection contre la mort cellulaire dans différents tissus (Pour revue, Christakos et coll., 2004). Cet effet antiapoptotique dans les ostéoblastes serait aussi lié à sa capacité de tampon calcique par chélation du calcium. Un autre mécanisme montre pour cet effet une interaction et une inhibition directes de l'activité de la caspase 3, effecteur crucial dans le processus de l'apoptose (Bellido et coll., 2000 ; Liu et coll., 2004).

#### **IV.A.7. La phosphatase alcaline tissu non spécifique ou TNAP**

Les phosphatases alcalines sont ubiquitaires dans de nombreuses espèces de la bactérie à l'être humain. Leurs localisations indiquent que ces enzymes ont des fonctions biologiques importantes particulièrement dans les tissus minéralisés. Quatre gènes codent pour des isoformes de la phosphatase alcaline. Trois gènes sont

spécifiques d'un tissu (placenta, embryon et intestin) (Millan, 2008). L'expression de la quatrième isoforme n'est pas spécifique à un seul tissu (TNAP) et est très abondante dans le foie et le rein. Elle est également présente dans l'os (ostéoblastes et le cartilage (chondrocytes hypertrophiques), dans les vésicules matricielles formées par ces deux tissus (Hoshi et coll., 1997 ; Miao et coll., 2002) et dans les cellules dentaires. L'hypophosphatasie due à une mutation du gène de la TNAP est associée avec des défauts du squelette et plus spécifiquement à une perte précoce des dents provisoires et permanentes (Whyte, 2001). Une souris mutée nulle de la TNAP a été générée (Waymire et coll., 1995). Elle présente un défaut d'initiation et de croissance des cristaux d'hydroxyapatite, qui sont inhibés dans la matrice entourant le cartilage et l'os.

In vitro, les ostéoblastes de la souris mutée nulle se différencient normalement mais ne peuvent initier la minéralisation.

Quand le régime de la souris mutée nulle est complété par la vitamine B6, elle ne présente pas de défaut important de la formation osseuse par contre, le seul processus de minéralisation qui n'est pas restauré, est la formation des incisives et plus spécifiquement de l'émail.

La phosphatase alcaline est donc connue pour s'exprimer dans différents types cellulaires (vésicules matricielles, ostéocytes) qui jouent un rôle prépondérant dans la formation des tissus minéralisés.

Dans les tissus minéralisés dentaires, elle a déjà été détectée dans des études par immunocytochimie (Gomez et Boyde, 1994) dans les améloblastes de mandibule de rat au stade de maturation.

#### **IV.A.8. Les protéines de la matrice amélaire**

Une connaissance précise de l'expression et de la distribution des espèces protéiques et glyco-lipido-protéiques et de leur transformation chimique extracellulaire est très importante pour la compréhension du processus de biominéralisation. Par ailleurs, le développement de la dent est régulé par des interactions séquentielles et réciproques entre cellules dérivées de la crête neurale, cellules épithéliales et environnement oral. Les mécanismes exacts de ces interactions ne sont pas encore entièrement connus. Cependant, la membrane basale et la matrice extracellulaire jouent un rôle fondamental. Ainsi, l'épithélium dentaire va se différencier en cellules productrices d'émail, les améloblastes. Lors du stade de présécrétion des améloblastes, la membrane basale sépare ces améloblastes des préodontoblastes. Cette membrane va disparaître pendant la phase de sécrétion, pour être remplacée par la matrice amélaire. Elle va supporter et réguler l'activité des améloblastes sécréteurs. Les améloblastes vont sécréter des protéines très particulières à l'intérieur de la matrice et ces molécules seront progressivement détruites enzymatiquement et remplacées par les ions calcium et phosphates pendant le stade de maturation de l'émail dentaire (Fukumoto, et coll., 2005). Les principaux éléments de la matrice extracellulaire de l'émail, produits par les améloblastes sécréteurs sont classés en deux grandes catégories : les amélogénines, qui forment 90% de la matrice amélaire lors de le stade de sécrétion, et des non-amélogénines, dont l'améloblastine et l'énaméline.



#### IV.A.8.a. Les Amélogénines

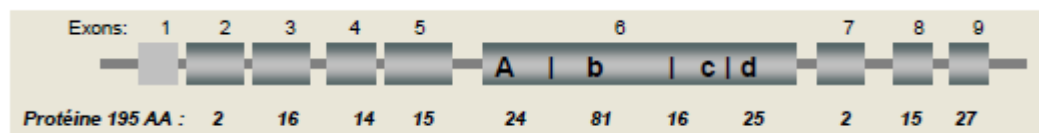
Les amélogénines sont les protéines majoritaires (90%) de la matrice organique de l'émail (Sasaki et Shimokawa, 1995) qui est le tissu le plus dur de l'organisme. Elles sont sécrétées par les améloblastes (Gibson et coll., 2001)

##### *\*Structure du gène et des protéines*

La localisation chromosomique du gène de l'amélogénine chez les différentes espèces a fait apparaître une singularité importante. Ce gène est porté par les chromosomes sexuels X et Y chez l'humain (Ikawa et coll., 2005), le bovin (Gibson et coll., 1991a ; Gibson et coll., 1991b ; Gibson et coll., 1992) alors que seul le chromosome X le porte chez la souris (Snead et coll., 1985 ; Lau et coll., 1992), le rat (Bonass et coll., 1994) et quelques singes (Lau et coll., 1989 ; Nakahori et coll., 1991 ; Gibson et coll., 1992).

Le gène porté par le chromosome X (AMELX) a été beaucoup plus étudié que le gène porté par le chromosome Y (AMELY). La démonstration chez l'homme d'une activité transcriptionnelle 10 fois moins importante pour AMEL Y a renforcé l'intérêt pour AMEL X alors que les deux gènes ont plus de 80% d'homologie (Salido et coll., 1992).

Structurellement, le gène AMELX murin et humain contient 9 exons (Baba et coll., 2002) (Figure 24). Des épissages alternatifs ont été mis en évidence pour plusieurs espèces. Ils touchent principalement les exons 3, 4 et 5 (délétion) et partiellement l'exon 6. Ces épissages conduisent à la synthèse de plusieurs transcrits (Li et coll., 1998 ; Papagerakis et coll., 2005 ; Bartlett et coll., 2006).



**Figure 24. Structure du gène de l'amélogénine**

Aujourd'hui, on ne parle plus de l'amélogénine mais des amélogénines car plusieurs versions protéiques ont été mises en évidence. Différents processus sont responsables de la synthèse de ces isoformes protéiques. L'épissage alternatif en est le mécanisme majeur (mis en évidence pour la première fois par Shimokawa et coll., 1987a et b). L'existence de deux promoteurs a été suggéré par Hu et coll. (1996).

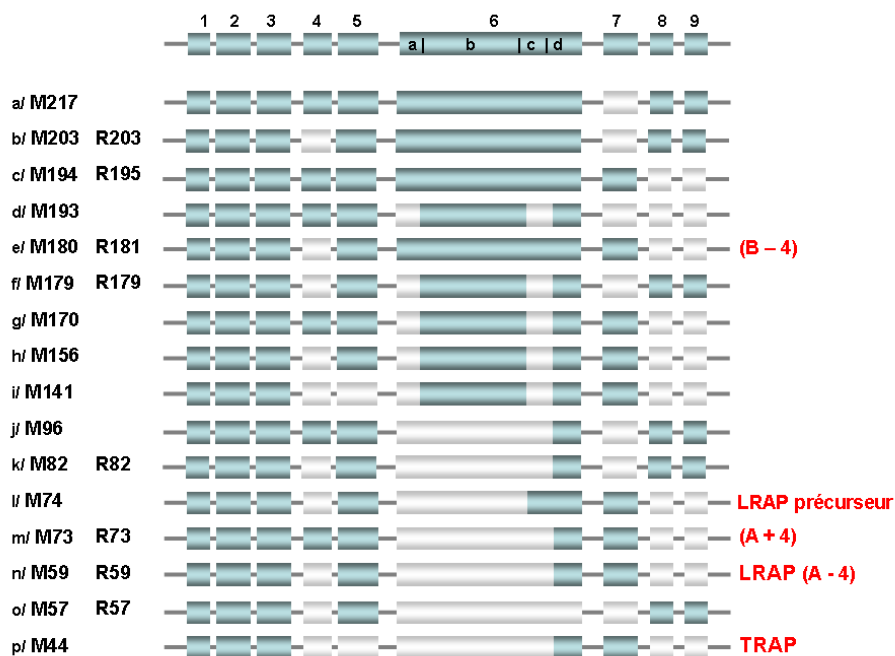
La présence de modifications post-transcriptionnelles (phosphorylation, glycosylation) et de peptides de dégradation (Fukae et Tanabe, 1998) contribuent à l'hétérogénéité de la population d'amélogénines (Bartlett et Simmer, 1999 ; Simmer et Hu, 2002).

*\*Synthèse protéique et isoformes*

Tous les transcrits semblent être traduits. Le transcrit le plus abondant, chez la majorité des espèces, correspond à un épissage unique de la totalité de l'exon 4 et donne, après traduction, une protéine avoisinant les 200 acides aminés. Les amélogénines sont les protéines majeures de la matrice organique amélaire. Elles sont sécrétées sous forme de protéines mères dont les séquences varient selon les espèces (Robinson et coll., 1998 ; Fincham et coll., 1999). Des protéines de tailles différentes sont produites à partir des ARN messagers obtenus pour une série d'épissages alternatifs (Gibson., 1999).

**Seize ARNm** ont été décrits chez le rongeur. Ils sont divisés en deux sous-populations selon leur site de terminaison (exon 7 ou exon 9) (Lau et coll., 1992 ; Simmer et coll., 1994 ; Hu et coll., 1997c ; Li et coll., 1998). Il existe deux sites de polyadénylation, chez le rat (Li et coll., 1998) et la souris (Papagerakis et coll., 2005).

La majorité des transcrits contient les exons 1 à 3 et une partie de l'exon 6. Sept transcrits contiennent les exons 8 et 9 (pour revue, Bartlett et coll., 2006). Le transcrit majoritaire code pour la protéine de 180 acides aminés (Snead et coll., 1983 ; 1985). L'exon le plus fréquemment épissé est l'exon 4 (Hu et coll., 1997c). Les exons 8 et 9 sont traduits en protéines et exprimés uniquement dans les stades précoces de la différenciation améloblastique (Papagerakis et coll., 2003). Le taux d'expression de ces différentes isoformes change suivant le tissu étudié et le stade de développement. Il diffère d'une espèce à l'autre (Yuan et coll., 1996 ; Chen et coll., 2000). Les transcrits contenant l'exon 4, par exemple, ne sont pas exprimés par les améloblastes (à PN=0,5), mais dans les odontoblastes et le stratum intermédiaire, c'est-à-dire des cellules ne formant pas de matrice amélaire (Figure 25).



**Figure 25.** Les épissages alternatifs de l'amélogénine

On ne connaît pas le rôle du transcrit M194 (forme longue incluant l'exon 4) qui s'exprime dans le stratum intermédiaire (Iacob and Veis, 2006).

**Les protéines** ont un très haut degré de polarité lié à leur peptide C-terminal très hydrophile et à leur phosphorylation. Après sécrétion par les cellules, elles sont localisées au niveau de la surface externe de l'émail nouvellement formé et subissent très vite une série de clivages enzymatiques (Fincham et Moradian-Oldak, 1996 ; Moradian-Oldak, 2001 ; Snead, 2003 ; Diekwish, 2009).

#### \*Propriétés et fonction des amélogénines

Les amélogénines constituent 90% de la partie organique de l'émail synthétisée (Butler et Ritchie., 1995) au stade de sécrétion. Elles sont les protéines clés de la minéralisation dentaire. Elles se lient entre elles pour former des nanosphères. Ces nanosphères représentent l'unité de base structurale de l'émail (Fincham et coll., 1995 ; Fowler et coll., 2006).

Cette protéine étant très vite dégradée lors de la maturation de l'émail, la plupart des études fonctionnelles ont été déduites à partir d'observations cliniques et ont été faites *in vitro*. Depuis l'obtention d'un premier modèle murin de mutant nul pour le gène de l'amélogénine, la fonction de cette protéine commence à être élucidée (Gibson et coll., 2001).

La synthèse des observations rapportées *in vivo* et *in vitro*, permet de leur attribuer plusieurs rôles aux amélogénines. Elles seraient responsables de l'organisation du patron du cristal et du contrôle de l'épaisseur de l'émail. Elles interviendraient notamment dans la régulation du développement des cristaux de minéraux et formeraient un réservoir en ions calciques ainsi qu'un support physique des cristaux en croissance et pourraient même être des molécules signales (Veis et coll., 2000 ; 2003 ; Tompkins et coll., 2005).

#### \*Mutations naturelles chez l'homme et description brève des phénotypes

Les amélogénines sont les composants majoritaires de la matrice amélaire. Un grand nombre de mutations du gène (14) (Lench et coll., 1995 ; Hart et coll., 2003 ; Kim et coll., 2004 ; Wright et coll., 2003 ; Bei, 2009) ont été décrites responsables de multiples phénotypes allant de l'absence totale d'émail (hypoplasique), à des défauts de minéralisation dus à une dégradation incomplète de la matrice amélaire (hypomaturation) (Wright et coll., 2003 ; 2006 ; Sawada et coll., 2010).

Ces différences proviennent de l'importance des conséquences de la mutation (liée à l'X, autosomale dominante ou autosomale récessive) sur la fonction de la protéine. Elles vont de la perte totale de la protéine due à une large délétion, à une mutation du peptide signal, à l'altération de certains domaines spécifiques.

La perte des exons 3 à 7 par délétion conduit à une forme hypominéralisée/hypomature (Lagerström-Fermer et coll., 1995).

Quatre mutations ont été décrites au niveau du peptide signal, la protéine est alors totalement absente et on retrouve un phénotype hypoplasique. D'autres mutations affectant la région codante N-terminale ont pour conséquence un phénotype hypomature avec des plages hypoplasiques. Cette région intègre le site de clivage de dégradation protéolytique de l'amélogénine.

Les 5 autres mutations introduisent un codon stop raccourcissant prématurément, la partie C-terminale de la protéine et conduisant à une forme hypoplasique. La partie C-terminale de l'amélogénine est particulièrement importante par sa capacité à lier les cristaux.

La mutation P52R donne une sévère hypoplasie mais pas d'anomalie de minéralisation. L'hydroxyapatite formée, sur le plan chimique et qualitatif, est normale (analyse XRD diffraction des rayons X et XRF fluorescent des rayons X) (Kida et coll., 2007 ; pour revue, Snead, 2003).

Une autre copie de l'amélogénine existe sur le chromosome Y, cependant aucune mutation humaine n'a été décrite (Lattanzi et coll., 2005).

#### \*Modèles animaux

Différents modèles animaux ont été générés, avec des délétions du gène ou d'une partie du gène de l'amélogénine. (Gibson et coll. 2001) ont publié une souris transgénique invalidée pour l'amélogénine et reproduisant le phénotype humain de l'amélogénèse imparfaite. La couche d'émail dans la souris KO est hypoplasique mais a une composition élémentaire compatible avec un minéral d'hydroxyapatite, ce qui suggère que les amélogénines ne sont pas indispensables pour l'initiation du cristal de minéral. Ces souris présentent également des anomalies radiculaires et des lacunes de résorption cémentaire. Chen et coll. (2003) ont généré une souris transgénique exprimant la séquence codant pour LRAP sous le contrôle du promoteur de l'amélogénine. Cette souris surexprime alors la protéine LRAP. L'émail des souris transgéniques présente des irrégularités de surface mais garde une structure normale. Le croisement de ces souris avec des femelles Amel-/- ne montre pas d'amélioration du phénotype amélaire (Pour revue Gibson et coll., 2005). Le croisement d'une femelle KO de l'amélogénine avec un mâle surexprimant le transgène M180 présente par contre un émail normalisé, et augmenté en épaisseur (Li et coll., 2006).

L'amélogénine s'exprimerait également au cours du développement radiculaire et parodontal (Diekwisch et coll., 2001). Cette localisation reste controversée par d'autres études (Bosshardt et Nanci, 1998). Janones et coll. (2005) montrent la présence d'épitopes de l'amélogénine dans les cellules de la gaine de Hertwig au stade initial.

La présence de l'amélogénine dans les cémentoblastes et les cellules ligamentaires a été mise en évidence par Hatakeyama et coll. (2006). Chez l'humain, la présence de l'amélogénine et de l'améloblastine a été montrée *in vitro* et *in vivo* dans les cémentoblastes contigus au ciment, les cellules paravasculaires et les cellules du ligament parodontal (Nunez et coll., 2010). L'amélogénine est également décelable dans la dent formée au

niveau des débris épithéliaux de Malassez mais uniquement dans des contextes physiopathologiques en réponse à une inflammation pulpaire (Fong et Hammarstrom, 2000) ou en conséquence de l'inactivation de l'homéogène Msx2 (Molla et coll., 2010).

Lors de la formation ectopique d'émail à la surface de la racine, les perles de l'émail, les cellules mésenchymateuses et épithéliales ainsi que les tubulis dentinaires qui les entourent, contiennent de l'amélogénine (Bosshardt et Nanci, 2003).

*\*Expression extradentaire*

Des études en immunohistochimie et en hybridation *in situ* montrent une expression de l'amélogénine dans les os longs, les cellules de moelle osseuse, les cellules cartilagineuses, les cellules épiphysaires des plaques de croissance, (Haze et coll., 2007) et plus récemment dans les débris épithéliaux de Malassez (Molla et coll., 2010), le ligament parodontal, l'os alvéolaire et aussi l'os basal (Haze et coll., 2009)

Elle s'exprime également dans les cellules de calvaria (Li et coll., 2006). Sur des cultures de cellules ES en condition ostéogénique, on note une expression de M180 avant la différenciation et de LRAP et M156 lorsque les cellules sont différenciées (Warotayanont et coll., 2008). Récemment, l'amélogénine a été identifiée également dans des tissus non minéralisés, comme le cerveau, les macrophages, des cellules du système hématopoïétique et les mégakaryocytes (Deutsch et coll., 2006) (Figure 26), mais également dans, la peau, le cerveau et les yeux (Li et coll., 2006).



Figure 26. Expressions de l'amélogénine (d'après Deutsch et coll., 2006)

**IV.A.8.b. L'Améloblastine**

L'améloblastine (améline ou sheathline) est la protéine la plus abondante de la matrice amélaire après l'amélogénine (Fincham et coll., 1999 ; Brookes et coll., 2001). C'est une glycoprotéine, bipolaire et hydrophile (Nanci et coll., 1998 ; Fukumoto et coll., 2004) qui subit de nombreuses modifications post traductionnelles

(Yamakoshi et coll., 2001 ; Hu et coll., 2005). Son ADNc a été identifié par trois groupes indépendants la même année (Fong et coll., 1996 ; Krebsbach et coll., 1996 ; Uchida et coll., 1996)

A l'origine, elle a été décrite comme exprimée exclusivement dans la dent (Krebsbach et coll., 1996). Le gène humain de l'améloblastine est localisé sur le chromosome 4q21 et contient 13 exons (Krebsbach et coll., 1996 ; Mardh et coll., 2001). Le gène code pour une protéine de 422 acides aminés qui correspond à une protéine de 45 kD et est rapidement clivée après sa synthèse.

La région N-terminale, basique, se concentre dans les prismes de l'émail (Uchida et coll., 1998), tandis que la partie C-terminale acide a une durée de vie plus courte et se trouve à la surface de l'émail entre les cristaux (Murakami et coll., 1997).

Trois isoformes de l'améloblastine ont été récemment identifiées (Ravindranath et coll., 2007) : une isoforme de 37-kDa appelée "early postnatal ameloblastin" et deux autres de 53-kDa et de 66-kD appelées "later postnatal ameloblastin". Leurs synthèses seraient dépendantes de l'avancée du stade de sécrétion en relation avec la sécrétion d'amélogénine pendant la formation de l'émail.

Certains auteurs lui avaient aussi suggéré un rôle de molécule signal entre l'épithélium et le mésenchyme (MacDougall et coll., 2000 ; Toyosawa et coll., 2000).

L'améloblastine est exprimée par les améloblastes de sécrétion (prolongement de Tomes) et se poursuit dans les améloblastes post-sécréteurs. Cette expression diminue ensuite au cours du stade de maturation. Elle est également exprimée dans la matrice, les cellules épithéliales de la gaine de Hertwig (Torres-Quintana et coll., 2005 ; Ravindranath et coll., 2007), les cellules du ciment cellulaire et dans les cellules épithéliales enfermées dans le ciment radiculaire (Lézet et coll., 2000b).

L'améloblastine est également exprimée au niveau odontoblastique notamment dans les préodontoblastes et les odontoblastes polarisés (Bègue-Kirn et coll., 1998) lors du développement dentaire (Fong et coll., 1998) et au niveau de la matrice dentinaire ainsi que dans les premières étapes de la réparation dentinaire après un traumatisme (Spahr et coll., 2002).

**L'améloblastine, utilisée en coiffage pulpaire direct, stimule la formation de dentine réparatrice (Nakamura et coll., 2006). Elle induirait la croissance de l'os en agissant sur les cellules progénitrices et en stimulant les régulateurs de l'immunité (Tamburstuen et coll., 2010).** Elle joue donc un rôle important dans la structure de la matrice amélaire ainsi que dans l'initiation de la minéralisation. Elle se localise à l'extrémité des prolongements de Tomes où a lieu l'initiation de la minéralisation (Nanci et coll., 1998 ; Fukumoto et coll., 2004). Dans la matrice amélaire, on la localise au niveau des espaces entre les prismes et l'émail inter-prismatique (Hu et coll., 1997b). On la retrouve, à l'inverse de l'amélogénine, plutôt au niveau de la surface cellulaire plus qu'au sein de la matrice (Nanci et coll., 1998). L'améloblastine est qualifiée de « sheath proteins », cette famille de protéines jouerait un rôle de barrière pour maintenir la liaison prisme/inter-prisme durant le

stade de sécrétion (Hu et coll., 1997b). Le produit de clivage de 17k Da est localisé dans l'émail externe nouvellement formée (Fukae et coll., 2006).

L'améloblastine est également exprimée dans des tissus non dentaires et jouerait un rôle important dans le développement du squelette cranio-facial osseux. En effet, elle est exprimée lors de l'ossification intramembranaire. On la localise dans les couches osseuses nouvellement formées et son expression diminue en même temps que l'os se forme. Elle aurait une action de molécule signal organisant les différentes étapes cellulaires comme la différenciation des pré-ostéoblastes en ostéoblastes. Au niveau de l'ossification endochondrale, l'améloblastine est exprimée au niveau du compartiment prolifératif, et diminue vers la zone hypertrophique. L'améloblastine est donc exprimée au niveau du tissu osseux cranio-facial, mais en moindre quantité qu'au niveau dentaire (Spahr et coll., 2006) ce qui lui conférerait une fonction de signalisation. Les études *in vitro* de culture de cellules ligamentaires confirment cette hypothèse. L'améloblastine montre une activité de type facteur de croissance. *In vitro*, sur des cultures de cellules du ligament parodontal, elle maintient l'expression de BMP2 et 4 et induit celle de BMP3 provoquant une expression de novo de l'ostéocalcine, de la BSP et diminue celle du collagène de type I (Zeichner-David et coll., 2006). L'améloblastine est montrée exprimée *in situ* par les cellules épithéliales de la gaine de Hertwig (Fong et coll., 1996 ; Fong et Hammarstrom, 2000 ; Lézot et coll., 2000a), et par PCR et Western-blot (Zeichner-David et coll., 2003). L'améloblastine est également détectée au niveau des débris épithéliaux de Malassez mais uniquement en réponse à une inflammation pulpaire (Hasegawa et coll., 2003) et à la mutation du gène *Msx2* (Molla et coll., 2010). Sur des cultures de cellules du ligament parodontal, elle permet une réparation cémentaire en augmentant l'activité ALP et la différenciation cellulaire (Fukae et coll., 2006).

L'améloblastine recombinante stimulerait la cicatrisation de l'os *in vivo*, et augmenterait la prolifération des cellules souches mésenchymateuses et aussi la différenciation des cellules précurseurs des ostéoclastes *in vitro* (Tamburstuen et coll., 2010). Des études *in vitro* et *in vivo* montrent la présence des transcrits de l'améloblastine dans des conditions pathologiques au niveau de l'os nouvellement formé (cellules souches mésenchymateuses, ostéoblastes et chondrocytes) (Tamburstuen et coll., 2011).

Les animaux invalidés pour l'améloblastine (Fukumoto et coll., 2004) présentent une amélogénèse imparfaite, l'émail ne se forme pas et les améloblastes se différencient dès la matrice synthétisée.

On observe une production d'amélogénines et des formes fragmentées d'améloblastine (Wazen, 2009).

L'inactivation de l'améloblastine a pour conséquence une absence de décussation des prismes (Caterina et coll., 2002). L'améloblastine inhibe la prolifération des améloblastes qui se dé-différencient dès la matrice synthétisée et elle serait donc importante pour maintenir les améloblastes dans un état différencié [Fukumoto et coll., 2004]. L'améloblastine permettrait l'adhésion des améloblastes à la matrice ce qui explique l'anomalie présentée par les souris invalidées. La sur-expression de l'améloblastine perturbe la morphologie des prismes conduisant à une forme d'amélogénèse imparfaite (Paine et coll., 2003).

Des résultats récents suggèrent que l'améloblastine et l'amélogénine pourraient agir de façon synergique sur la différenciation des cémentoblastes et dans la synthèse du ciment (Nuñez et coll., 2010).

#### **IV.A.8.c. L'Énaméline**

L'énaméline a été clonée et caractérisée dans l'émail de porc (Hu et coll., 1997a) et de la souris (Hu et coll., 1998 ; 2001b). C'est une glycoprotéine de 125 kDa. Elle est codée par un gène de 10 exons localisé sur le chromosome 4 en q21 chez l'homme (Dong et coll., 2000 ; Hu et coll., 2000b). L'énaméline est fortement glycosylée, acide et hydrophile.

Elle est présente en faible quantité dans la matrice amélaire (1-5%) (Yamakoshi et coll., 1998 ; Hu et coll., 2001a) et elle joue un rôle dans la minéralisation où elle est impliquée dans la croissance et l'élongation des cristaux de l'émail ou elle est localisée à la surface des cristaux d'apatite (Hu et coll., 2008). Dans l'incisive de rat, l'énaméline est exprimée fortement au niveau des améloblastes sécréteurs et dans la matrice amélaire. Elle est également intensément exprimée dans les odontoblastes au début de la phase de maturation, puis son expression disparaît au stade de maturation plus avancé (Liu et coll., 2010).

Des études immunohistochimiques dirigées contre la forme de 89 kDa montrent une distribution en forme de nid d'abeille (« honeycomb »). Cette isoforme de l'énaméline est localisée au niveau de l'émail prismatique et inter-prismatique et est absente des espaces de la gaine du prisme.

Le second fragment clivé de 32 kDa, le plus stable, a une forte affinité pour l'hydroxyapatite *in vivo* (Tanabe et coll., 1990 ; Hu et coll., 1997a ; Fan et coll., 2008). *In vitro*, elle accélère de façon dose-dépendante la nucléation de l'hydroxyapatite en coopérant avec l'amélogénine (Bouropoulos et Moradian-Oldak, 2004 ; Fan et coll., 2009).

L'énaméline, tout comme l'amélogénine, subit une dégradation lors de la maturation de l'émail générant des peptides actifs pour l'amélogénèse (Moradian-Oldak et coll., 1996 ; Dohi et coll., 1998), répartis différemment dans l'émail en formation (forme native et clivée contenant la région C-terminale dans les couches superficielles ; les autres formes dans les couches profondes de l'émail) (Hu et coll., 1997a).

Une étude en transgénèse montre que l'énaméline est indispensable à l'initiation de la minéralisation et contribue à la dureté de l'émail (Masuya et coll., 2005). Les études histologiques de l'émail humain de patients porteurs d'une mutation de ce gène, confirment ces différents phénotypes cliniques, qui peuvent aller d'une absence totale d'émail à des hypoplasies localisées avec une déformation des prismes, voire à une absence de structure prismatique (remplacée par une structure lamellaire parallèle à la jonction amélo-dentinaire ; Hart et coll., 2003 ; Pavlic et coll., 2007 ; Gopinath et coll. 2008).

L'énaméline est donc impliquée dans la formation de l'émail et de la matrice amélaire. Elle pourrait jouer un rôle important dans la transduction du signal au cours de la formation de la matrice (Al hashim et coll., 2009 ; Liu et coll., 2010). Chez l'humain, les mutations du gène de l'énaméline sont à l'origine d'une amélogénèse



imparfaite autosomale dominante (Hu et coll., 2008 ; Lindemeyer et coll., 2010). Selon Sawada et coll. (2010), elle pourrait agir comme une molécule d'adhésion et serait impliquée dans le processus précoce de différenciation et de développement des améloblastes.

Différents modèles de souris mutées pour l'énaméline ont été générés par des expériences de mutagenèse dans le locus de l'énaméline. Les souris montrent dans le locus du gène de l'énaméline une atteinte amélaire comparable à celle observée avec une amélogénèse imparfaite : Le premier modèle (*ENAMRgsc521*) obtenu par une mutation au niveau du peptide signal induit une perte de 97% de la structure primaire de la protéine. Les souris homozygotes ne synthétisent pas d'email. Ceci montre que l'énaméline est une protéine indispensable à l'initiation de la minéralisation.

Chez les souris hétérozygotes, on observe un phénotype d'haploinsuffisance, avec un email piqueté hypominéralisé et hypomature.

Deux autres souris (*ENAMRgsc395* *ENAMRgsc514*) présentent des mutations ponctuelles. Les souris hétérozygotes présentent un phénotype hypoplasique (Masuya et al., 2005). Seedorf et coll. (2007) décrivent une quatrième mutation qui, chez les souris hétérozygotes, donne des altérations de structure de l'email, et chez les souris homozygotes, une absence totale de formation amélaire.

La délétion complète du gène par Knock-in conduit à une absence totale de formation amélaire (Hu et coll., 2008a).

#### **IV.A.8.d. Les Protéines de la matrice amélaire et la minéralisation dentaire**

La formation de l'email est le résultat d'une série de processus étroitement contrôlés lors des étapes de sécrétion, de transition, de maturation et de protection. Lors de l'amélogénèse, l'assemblage des protéines matricielles amélaire joue un rôle critique pour la régulation de la croissance des cristaux et la morphogénèse amélaire.

L'email dentaire est un matériel biocéramique composite très différent de la dentine et de l'os.

A l'état mature, il est totalement acellulaire et formé principalement d'hydroxyapatite (95% de son poids), ce qui en fait le tissu le plus dur du corps des vertébrés. L'email est formé de cristaux extrêmement longs et fins d'hydroxyapatite (HAP) disposés d'une manière très organisée dans les prismes de l'email.

Durant le stade initial de l'amélogénèse (phase de sécrétion), de longs et fins cordons d'email minéralisés sont formés, presque en même temps que l'améloblaste sécrète les protéines de la matrice amélaire. Ceci suggère que la minéralisation de l'email se fait dès la migration des protéines de l'email dans le compartiment extracellulaire et s'oppose à la situation des tissus à charpente collagénique qui présentent tous une région non minéralisée, pré-dentine, ostéoïde, ou cémentoïde qui sépare la cellule sécrétrice du compartiment minéralisé.

Ces « cordons minéraux » de l'émail sont extrêmement longs (>100 µm), s'étendant sur la couche d'émail, mais très réduits dans leur diamètre initial (10 nm). Cette phase minérale occupe 10 à 20% du volume de l'émail et est déjà organisée, ce qui constitue l'échafaudage des prismes de l'émail. Pendant la phase de sécrétion, les grands axes de ces cristaux (axe-c) sont co-alignés et disposés parallèlement par région intra- et extra-prismatique.

Lors de l'étape de maturation, les protéines matricielles amélaire sont presque totalement dégradées par les protéases résidentes de la matrice, l'énamélysine (ou MMP-20) et la kallicréine-4. Au fur et à mesure que les protéines quittent l'émail, les cordons minéraux croissent très rapidement en épaisseur (axe b) et en largeur (axe a) pour être à l'origine d'un tissu très minéralisé (moins de 1% de protéines dans sa composition) présentant l'organisation cristalline établie pendant la sécrétion. Il y aurait, alors, une relation fonctionnelle entre la dégradation de la matrice organique et la croissance de la partie minérale. C'est précisément la nature transitoire de la matrice amélaire qui fait la spécificité de ce système de biominéralisation (Margolis, et coll., 2006) Les données cliniques ont montré que les protéines de l'émail sont essentielles à une amélogénèse normale. Dès 1991, la première mutation du gène AMELX a été rapportée liée à l'amélogénèse imparfaite héréditaire (AIH) liée au chromosome X (Lägerstrom et coll., 1991). En 2001, les AIH de forme autosomique largement plus fréquentes, furent montrées liées à la mutation du gène de l'énaméline (Rajpar et coll., 2001). Pour l'améloblastine, aucune mutation n'a été montrée associée à une AIH. Cependant, des mutations somatiques seraient existantes dans des tumeurs odontogènes (Gomes et coll., 2010)

Etant donné que 95% des protéines de l'émail sont des amélogénines, la plupart des recherches scientifiques se sont focalisées sur l'étude de cette protéine majoritaire, ses isoformes et leurs produits de clivage (Lyngstadaas et coll., 2009). De ce fait, plusieurs investigations ont démontré le rôle essentiel de l'amélogénine pendant l'assemblage de la matrice organique extracellulaire. Et ceci d'autant plus que l'Amélogénèse Imparfait Héréditaire (AIH) liée à l'X observée en clinique est induite par des mutations du gène de l'amélogénine localisé sur le chromosome X (Paine, 2005).

La souris mutée nulle pour le gène de l'amélogénine a un phénotype amélaire similaire à celui de l'AIH (Gibson, et coll., 2001), c'est-à-dire, une très fine couche minérale à la surface de la dent, dénuée des prismes. De même, la mutation d'un facteur de transcription régulateur de l'expression du gène codant pour l'amélogénine tel que MSX2, chez la souris, va se traduire par une AIH (Aïoub et coll., 2007 ; Molla et coll., 2010).

Le haut niveau de conservation du gène de l'amélogénine nous indique l'importance de la structure de cette molécule pour la formation et la minéralisation de l'émail au niveau structural (motifs carboxy- et amino-terminaux). Les amélogénines sont des molécules de nature hydrophobe, dont le noyau est composé d'acides aminés Pro, Leu, His, et Gln, tandis que la région C-terminale est composée d'une séquence hydrophile.

Un des aspects les plus remarquables de l'amélogénine est sa capacité à s'autoassembler en « nanosphères », qui vont constituer l'élément structural primordial lors de la phase de sécrétion de la matrice extracellulaire. L'auto-assemblage de l'amélogénine dépend de l'existence de sites de reconnaissance spécifiques.

Le domaine A, des résidus 1 à 42 du segment N-terminal, et le domaine B, des résidus 157 à 173 du segment C-terminal, vont jouer un rôle essentiel lors des interactions amélogénine-amélogénine. Au niveau extracellulaire, l'autoassemblage et la solubilité de la molécule de l'amélogénine dépendent de conditions de température, du pH et de la présence d'ions métalliques polyvalents comme le calcium (Habelitz et coll., 2005.). Les nanosphères constituent la microstructure qui va orienter la croissance des cristaux, au travers d'interactions du type protéine-minéral. Les systèmes de contrôle de la croissance cristalline seraient la prévention de la fusion prématurée des cristaux et la modulation de leur morphologie et de leur élongation. Ainsi, l'amélogénine serait d'abord une enveloppe protectrice des cristaux d'émail néoformés lors de la phase précoce de sécrétion, pour ensuite interagir sélectivement avec certaines faces des cristaux tout en modulant leurs taux de croissance, la morphologie et l'orientation des cristaux.

La participation de l'améloblastine dans l'amélogenèse a été d'abord suggérée par la localisation de cette protéine au niveau du prolongement de Tomes où elle jouerait un rôle de barrière pour maintenir les liaisons inter-prismatiques durant le stade de sécrétion (Hu et coll., 1997). De plus, il a été observé que les souris sur-exprimant l'améloblastine présentent des défauts qui ressemblaient à l'AIH (apparence des cristaux et morphologie des prismes de l'émail) (Paine et coll., 2003). L'analyse des souris mutées nulles pour le gène de l'améloblastine a aussi révélé de nombreuses anomalies, notamment l'absence de tissu amélaire. Les cellules de l'épithélium dentaire chez la souris invalidée se différencient en améloblastes sécréteurs, puis se détachent de la matrice, et se différencient après le début de la phase de sécrétion. Dans ce cas, l'améloblastine est considérée comme une molécule d'adhésion cellulaire qui permettra le maintien de l'améloblaste dans un état de différenciation grâce à l'attachement de cette cellule à leur matrice. Ces résultats, montrent que l'améloblastine, peut fonctionner comme un promoteur du processus de formation de l'émail (modèle d'inactivation) et qu'elle peut aussi agir comme inhibitrice si elle présente des niveaux trop élevés (modèle de surexpression). Cependant, des études ultérieures ont démontré que les souris améloblastine -/- analysées (Fukumoto et coll., 2004) exprimaient en fait une forme tronquée d'ARN, et donc qu'une isoforme protéique serait exprimée (Wazen et coll., 2009).

Quant à l'énameline, la souris invalidée pour ce gène présente un émail anormal avec une absence de minéralisation du côté de la surface sécrétoire de l'améloblaste (Hu et coll., 2008). Par ailleurs, la mutation ponctuelle du gène codant pour l'énameline va aboutir à une amélogenèse imparfaite chez la souris et chez l'homme (Seedorf et coll., 2007 ; Masuya et coll., 2005).

Même si la littérature est moins abondante et parfois contradictoire, il est important de garder à l'esprit que l'amélogénine peut fonctionner seule et d'une façon coordonnée avec les autres protéines de la matrice

extracellulaire, comme l'améloblastine et l'énaméline. Un fait à souligner est que pendant le stade de présécrétion, lorsque les protéines de l'émail commencent à s'accumuler de façon extracellulaire et que la matrice n'est pas encore minéralisée, les granules sécrétoires des améloblastes contiennent seulement des amélogénines. Par contre, lors du stade de sécrétion, les granules contiennent en plus les deux protéines, améloblastine et énaméline, ce qui peut être interprété comme une relation d'interdépendance fonctionnelle. Le modèle de souris doublement invalidées pour l'améloblastine et l'amélogénine (Hatakeyama et coll., 2009) a montré que les défauts au niveau de l'émail étaient encore plus prononcés que ceux des souris invalidées pour un seul gène (amélogénine ou améloblastine), ce que renforce l'idée d'une synergie entre ces deux protéines. Les mécanismes par lesquels les protéines matricielles amélares interagissent et leur façon d'organiser et de moduler la croissance des cristaux de phosphate de calcium d'une façon coordonnée, sont assez mal connus. D'une manière très générale, au niveau des systèmes de minéralisation, les domaines hydrophobes, comme ceux de l'amélogénine, seraient responsables de l'échafaudage structural dans la formation de matrice. L'améloblastine et l'énaméline pourraient interagir avec les nanosphères au travers de domaines de liaison du type-lectine, afin de stabiliser l'amélogénine qui est présente sur la matrice (Moradian-Oldak et coll., 2001). Les domaines hydrophiles d'AMELX et les molécules, telles que certaines régions de l'amélogénine ainsi que l'améloblastine et l'énaméline, seraient impliquées dans la régulation des phénomènes de nucléation et de croissance des cristaux. De plus, certaines formes d'amélogénine sont aussi capables d'inhiber la croissance des cristaux en adhérant à leur surface. La troisième molécule de la matrice extracellulaire, l'énaméline, peut remplir, elle aussi, cette fonction d'inhibition alors que certains produits de son clivage possédant un domaine N-acétylglucosamine, peuvent promouvoir la formation d'apatite, grâce à leur association avec les amélogénines (Margolis, 2006). Ce sont donc les interactions macromoléculaires de l'amélogénine, de l'améloblastine, de l'énaméline et de leurs isoformes qui contrôlent la morphogénèse de l'émail et participent au contrôle de la minéralisation.

## **V. RESULTATS**

### **V.A. ANALYSE DE L'EXPRESSION DES EFFECTEURS DE L'ODONTOGENESE**

#### **“Mise au point des outils d’analyse et application à l’étude de la régulation par une hormone (la vitamine D3) et un facteur de transcription (l’homéoprotéine Msx2)”**

Ce diplôme de Doctorat réunit une vingtaine d’années de production scientifique issue d’un travail personnel (publications en premier auteur aux étapes-clés de l’évolution du sujet scientifique) et de support à la métamorphose progressive des approches expérimentales et des concepts-mêmes de la biominéralisation.

Une sélection des avancées marquant ce parcours est présentée et retrace :

- (1) La cartographie étape par étape de l’expression des gènes et des protéines impliquées dans l’histogenèse dentaire plus particulièrement centrée sur les améloblastes
- (2) La rupture des frontières tissulaires par la découverte de l’expression et de la régulation d’une protéine de l’émail dans la dentine, en relation avec le déséquilibre systémique d’une voie hormonale, la vitamine D.
- (3) L’exploitation des modèles mis au point dans les situations physiologiques pour l’analyse des mécanismes de régulation constitutifs de ces protéines dans l’amélogénèse.

#### **V.A.1. ARTICLE 1. “Singularité des tissus minéralisés dans l’hybridation in situ par la levée du verrou méthodologique de la décalcification”.**

**HOTTON D., DAVIDEAU J.L., BERNAUDIN J.F., BERDAL A.** *In Situ Hybridization of Calbindin-D<sub>28k</sub> Transcripts in Undecalcified Sections of the Rat Continuously Erupting Incisor. Connective Tissue Research, 1995)*

#### **V.A.2. ARTICLE 2. “Analyse de l’expression et de la fonction d’une enzyme-clé de la biominéralisation : de l’ARN à la protéine à l’activité enzymatique dans le modèle expérimental de l’incisive à croissance continue”**

**HOTTON D., MAURO N., LÉZOT F., FOREST N., BERDAL A.** *Differential Expression and Activity of Tissue-nonspecific Alkaline Phosphatase (TNAP) in Rat Odontogenic Cells in Vivo. The Journal of Histochemistry and Cytochemistry, 1999)*

#### **V.A.3. ARTICLE 3. “Utilisation du modèle de l’incisive à croissance continue dans l’exploration de l’impact de la vitamine D sur l’expression des protéines de l’émail. Expression de l’amélogénine dans les deux composants tissulaires de la dent, émail et dentine”**

**PAPAGERAKIS P., MacDOUGALL M., HOTTON D., BAILLEUL-FORESTIER I., OBOEUF M., BERDAL A., FOREST N., BERDAL A.** *Expression of amelogenin in odontoblasts. Bone, 2003*

#### **V.A.4. ARTICLE 4. “Analyse des schémas constitutifs d’un facteur de transcription dans les cellules dentaires épithéliales : Rôle de Msx2 dans la régulation des amélogénines et impact physiopathologique dans la dent et le parodonte”**

**MOLLA M., DESCROIX V., AÏOUB M., SIMON S., CASTANEDA B., HOTTON D., BOLANOS A., SIMON Y., LEZOT F., GOUBIN G., BERDAL A.** *Enamel protein regulation and dental and periodontal physiopathology in Msx2 mutant mice. American Journal of Pathology, 2010)*

## V.A.1. ARTICLE 1

**HOTTON D., DAVIDEAU J.L., BERNAUDIN J.F., BERDAL A.** *In Situ Hybridization of Calbindin-D28k Transcripts in Undecalcified Sections of the Rat Continuously Erupting Incisor. Connective Tissue Research, 1995.*

L'objectif de cette première publication a été l'analyse de l'expression de protéines impliquées dans les mouvements calciques et la biominéralisation.

L'amélogénèse, modèle et centre majeur pour cette étude, résulte de l'intégration fonctionnelle au niveau de l'épithélium adamantin interne des processus couplés de sécrétion-destruction matricielles et de flux ioniques (calcium, phosphate) qui varient avec la séquence de différenciation et de maturation des améloblastes.

Ces activités aboutissent à la mise en place d'un ensemble extracellulaire matriciel et organique en constante évolution qui associe la nucléation et la croissance des cristaux d'hydroxyapatite.

La calbindine-D<sub>28k</sub> est une calciprotéine appartenant à la superfamille de la troponine C (protéines à motif EF Hand). Elle fait partie de la classe des tampons calciques (Gifford et coll., 2007) et forme avec la calbindine-D<sub>9k</sub> un sous-ensemble de calciprotéines mobiles. Elles s'expriment dans différents types cellulaires chez les mammifères, le rein, le cervelet, le cerveau, les organes des sens, le cartilage et l'os. Elle participe à l'homéostasie calcique intracellulaire.

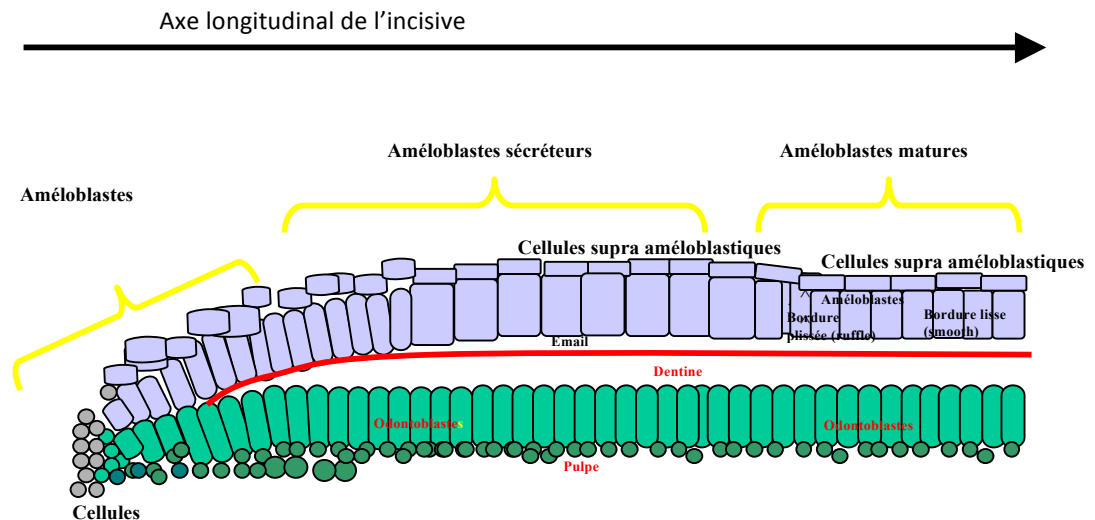
Afin d'étudier le schéma d'expression de son gène au cours du développement mandibulaire après la naissance, l'hybridation *in situ* a été réalisée pour la première fois sur notre modèle d'étude : l'incisive non décalcifiée de rat âgé de 15 jours, 30 jours et 56 jours.

Le modèle de l'incisive à croissance continue de rongeur (principalement l'incisive mandibulaire de rat) est caractérisé depuis les années 70 (Smith et Warshawsky, 1975 a, b ; 1977 ; Selvig, 1983).

Ce modèle s'est très vite avéré d'un grand intérêt par son organisation spatio-temporelle qui permet l'étude linéaire de la différenciation et de la maturation des cellules impliquées dans la formation et la biominéralisation des tissus minéralisés dentaires et de la biochimie de la matrice amélaire. L'incisive à croissance continue a été utilisée aussi bien pour des études *in situ*, que pour l'analyse biochimique des protéines et des ARNm (Beertsen et Niehof, 1986 ; Martineau-Doizé et coll., 1991 ; Berdal et coll., 1993 ; Davideau et coll., 1995 ; 1996 ; Hotton et coll., 1995 ; 1999 ; Robinson et coll., 1995 ; 1998 ; Young, 1995 ; Smith, 1998). Elle présente une partie labiale analogue à la couronne des molaires et une partie linguale analogue à la racine des molaires. Dans sa partie labiale, il est possible de distinguer, en remontant l'incisive de la zone apicale vers la zone de jonction avec l'épithélium buccal, l'ensemble des étapes de l'amélogénèse et de la dentinogénèse (Berdal et coll., 1991a ; Martineau-Doizé et coll., 1991 ; Linde et Goldberg, 1993 ; Robinson et coll., 1995 ; Smith et Nanci, 1995). Dans la partie linguale, la même remontée de la zone apicale vers la zone de jonction avec l'épithélium buccal, permet de suivre l'ensemble des étapes de la dentinogénèse radiculaire, de

la cémentogenèse acellulaire et, de manière plus large, de la formation du ligament parodontal (Selvig, 1983 ; Beertsen et Niehof, 1986). Ce modèle d'incisive à croissance continue de rongeur est le modèle que nous avons utilisé au laboratoire.

La figure ci-dessous le présente schématiquement dans son volet labial.



**Figure 27. Notre modèle de l'incisive à croissance continue**

Pour les tissus minéralisés, un prétraitement de décalcification était requis pour faciliter les coupes et dans la littérature, il avait été rapporté que ce prétraitement n'altérait pas la détection in situ de plusieurs ARNm codant pour des protéines matricielles (Lukinma et coll., 1993).

Toutefois, après décalcification à l'EDTA, le bruit de fond de nos contrôles négatifs s'était avéré de même intensité que le signal dans les cellules qui exprimaient les calbindines D<sub>9K</sub> et D<sub>28K</sub>.

La difficulté de ce travail a résidé donc dans le fait de ne pas décalcifier nos échantillons.

Pour surmonter ce verrou technologique, nous avons mis au point une technique de dissection nous permettant de prélever l'épithélium et le mésenchyme en les séparant physiquement des tissus minéralisés environnants pour ensuite les enrober pour les couper au cryostat. L'originalité de ce travail réside dans le fait qu'il existait peu de données sur la formation de l'émail.

Ce travail analyse le schéma d'expression au niveau des transcrits pendant l'amélogénèse, plus particulièrement le schéma d'expression des ARN codant pour la Calbindine-D<sub>28K</sub>.

Les résultats montrent que la quantité d'ARNm de la calbindine D<sub>28K</sub> présente deux phases de fluctuation. Deux niveaux d'expression maximum ont été observés pendant le stade de présécrétion et l'initiation du stade de maturation.

Le schéma d'expression des transcrits de la calbindine-D<sub>28K</sub> varie de façon similaire à la variation de la concentration en protéine montrée par Berdal et coll. (1991).

Ces données ont suggéré que le contrôle de la transcription du gène de la calbindine D<sub>28K</sub> comporte deux étapes d'initiation de la transcription qui se superpose aux deux étapes de la minéralisation.

La calbindine D<sub>28K</sub> jouerait donc un rôle déterminant dans les échanges calciques pendant l'amélogénèse.

Les différences de concentration de la protéine calbindine -D<sub>28K</sub> fluctue en parallèle avec les concentrations de transcrits mais avec un délai. Ce délai correspond à une modulation traductionnelle qui suit les transformations cycliques des améloblastes de maturation (bordure lisse et bordure plissée).



## ***In Situ* Hybridization of Calbindin-D 28 k Transcripts in Undecalcified Sections of the Rat Continuously Erupting Incisor**

D. HOTTON,<sup>†</sup> J. L. DAVIDEAU,<sup>†</sup> J. F. BERNAUDIN,<sup>‡</sup> and A. BERDAL<sup>†</sup>

<sup>†</sup>Inserm U.120, Hôpital R. Debré Paris, France; <sup>‡</sup>Service d'Histologie—Biologie Tumorale, Univ Paris VI, Hôpital Tenon, Paris, France

(Received July 5, 1994; accepted August 26, 1994)

Calbindin-D9k and calbindin-D-28k genes are useful systems to investigate the tissue- and stage-specificity as well as the hormonal control of gene expression. Since they regulate cellular calcium mobilization, their study may be of interest in mineralized tissues. However, thus far, immunocytochemical labelling has been mainly realized in these systems. In order to set up methods for mRNA investigation, *in situ* hybridization of calbindin-D28k mRNAs was performed in the continuously erupting incisor of Sprague-Dawley rats (15-, 30-, and 56-day-old). <sup>35</sup>S UTP labelled antisense and sense riboprobes specific for brain calbindin-D 28k were used for *in situ* hybridization. Specific and non-specific signals could not be discerned when studying decalcified samples. In contrast, on sections not pretreated with EDTA, calbindin-D 28k transcripts (in tooth and kidney) appeared strongly labelled with antisense probes, while sense probes provided a negligible background. In ameloblasts, the signal (i.e., calbindin-D 28k mRNA levels) increased during the presecretory stage. Different mRNA gradients and subcellular distribution patterns characterized the secretory and maturation stages. A nuclear labelling was observed, associated with the highest levels of transcripts. These data suggest a developmental control of calbindin-D28k mRNA transcription. Calbindin-D28k gene expression appears to be up-regulated during the initiation of both secretory and maturation stages of enamel mineralization.

**Key Words:** vitamin D, calbindin, bone, tooth, parvalbumin

### **INTRODUCTION**

Calbindin-D9k and calbindin-D28k genes constitute particularly accurate tools for the investigation of tissue-specific as well as hormonal control of gene expression. The organization of specific sets of DNase I-hypersensitive sites may confer the tissue-specific expression of calbindin-D9k.<sup>1</sup> The hormonal regulation varies according to the tissue, vitamin D-dependent in the duodenum,<sup>2</sup> estrogen-dependent in the uterus<sup>3</sup> and unresponsive to vitamin D and estrogen actions in the lung.<sup>2</sup> The two different calbindin-D genes are vitamin D-dependent in teeth.<sup>4</sup> Both genes are expressed in the enamel organ while the dental pulp contains exclusively calbindin-D28k mRNAs.<sup>4</sup> Moreover, calbindin-D9k and calbindin-D28k genes may provide useful tools to investigate the developmental control of gene expression. Calbindin-D9k in rat<sup>5</sup> and calbindin-D28k mRNAs in chicken<sup>6</sup> have been shown to vary depending on the position along the crypt-villus axis at which the enterocyte life-cycle is observed. Similarly, along the longitudinal axis of the rat

incisor, co-distribution and co-variations of the two calbindin proteins have been described in ameloblasts throughout the presecretory, secretory and maturation stages of amelogenesis.<sup>7</sup> The concentration of the two proteins inside the cytosol of ameloblasts may be controlled at different levels of synthesis (transcriptional, post-transcriptional, translational and post-translational) and degradation. The sensitivity and cellular resolution of *in situ* hybridization histochemistry<sup>8</sup> make it the method of choice for studying some aspects of the control of gene expression: the steady-state level and distribution of mRNAs. Calbindin-D28k transcripts were therefore investigated on undecalcified sections of the rat continuously erupting incisor.

### **MATERIAL AND METHODS**

#### **Animals**

Sprague Dawley rats (15-, 30- and 56-day-old) were purchased from CERJ (St Aubin les Elboeuf, France). They were anesthetized by Pentothal (5 µl/10 g of body weight; Sanofi, Paris, France), and fixed by intracardiac perfusion with 4% paraformaldehyde (PFA) in phosphate buffered

Address for correspondence: D. Hotton, U.120 Inserm Hôpital R. Debré, 48, Bd Serurier, 75019 Paris, France

saline 0.1 M (PBS) pH 7.3 for 15 min. After immersion in the same fixative for 1 hr 45 min, the incisors and kidneys were microdissected. 7  $\mu$ m-sections were made with a cryostat at  $-30^{\circ}\text{C}$  (Leica, Paris, France), either with or without decalcification of the teeth for 3 weeks in 4.13% EDTA in 0.1% PFA.

### ***In Vitro* Transcription**

Reagents and enzymes were obtained from Sigma (la Verpillière, France). For generating sense and antisense RNA probes, the transcription vector pGEM4-bluescript (Promega Coger, France) included a 2 kb cloned calbindin-D28k cDNA<sup>9</sup> (provided by C. Perret *et al.*, Inserm U120, Paris, France). *In vitro* transcription conditions of sense and antisense RNAs after appropriate linearization (Bam HI digestion for sense probe and Hind III digestion for antisense probe) were those recommended, by the manufacturer with <sup>35</sup>S-UTP (1000 Ci/mmol; Amersham, les Ulis, France). The incorporation of <sup>35</sup>S-UTP was 75–95%. The labelled RNA riboprobes were evaluated by electrophoresis. *In situ* hybridization was performed according to Lebargy *et al.*<sup>8</sup> with modifications related to the nature of the tissues.

### **Pretreatments**

Sections were immersed in 4% PFA in 0.1 M PBS for 10 min and washed for 10 min in 0.1 M PBS. Subsequently, all sections were washed again in 2 $\times$  SSC for 10 min and acetylated for 10 min in 0.1 M triethanolamine pH 8 containing 0.1% acetic anhydride under constant agitation. After washing for 10 min in 2 $\times$  SSC, the sections were incubated in Tris-glycine 0.1 M for 30 min under slow agitation. They were rinsed briefly in 2 $\times$  SSC and dehydrated in solutions of increasing ethanol concentrations and stored in dried-air until hybridization.

### **Hybridization**

A drop of 20  $\mu$ l hybridization buffer (50% deionized formamide, 20% dextran sulfate, 10 mM DTT, 500  $\mu$ g/ml sheared salmon sperm DNA, 10  $\mu$ g/ml tRNA, 4 $\times$  SSC) containing 10<sup>6</sup> cpm of either <sup>35</sup>S-UTP labelled sense or antisense RNA was applied on each section and covered with a piece of parafilm in a humidified chamber at 48 $^{\circ}\text{C}$  for 16 hr. Following hybridization, the sections were briefly rinsed in 4 $\times$  SSC at 52 $^{\circ}\text{C}$ . Next they were rinsed in decreasing concentrations of SSC at 52 $^{\circ}\text{C}$  and at room temperature before treatment with RNase A. They were subsequently dehydrated in solutions of increasing ethanol concentrations and air-dried. Autoradiography was performed after dipping in LMI emulsion (Amersham). Slides were placed in light-free conditions at 4 $^{\circ}\text{C}$  for 2

to 7 weeks, developed and counterstained with toluidine blue (R.A.L, Paris, France). Sections were mounted with Depex mounting medium (Osi, Paris France), covered with glass coverslips, examined and photographed using model Axioplan (Zeiss, Germany).

## **RESULTS**

### **mRNA Labelling in the Kidney (Plate 1)**

Rat kidney cryostat sections were used to assess the specificity of our *in situ* hybridization protocol using <sup>35</sup>S-labelled RNA probes. Using antisense probes, the calbindin-D28k mRNAs appeared located in the epithelial cells of the distal convoluted tubules (Fig. 1). Sense probes provided a very weak background (Fig. 2).

### **Presecretory Stage Ameloblasts (Plate 2)**

The terminal differentiation of ameloblasts was characterized by their increasing degree of polarization (Figs. 3–5). Calbindin-D28k mRNAs were first detected (Fig. 3) in preameloblasts facing undifferentiated mesenchymal cells. They dramatically increased in presecretory ameloblasts (Fig. 4) facing early differentiated odontoblasts. At this stage of development, mRNAs were distributed in the whole cytoplasm and were also present in the nucleus. An intense labelling was still observed in presecretory ameloblasts (Fig. 5) adjoining mineralizing mantle-dentine, but was restricted to the central and distal parts of the cell body.

### **Secretory Stage Ameloblasts (Plate 3)**

A gradient of mRNA labelling was observed along the incisor longitudinal axis (Figs. 6–8). A striking decrease in the mRNA signal was observed related to the deposition of the enamel matrix. This is illustrated on selected areas of the initial (Fig. 6) and terminal (Fig. 7) layers of inner prismatic enamel and the layers of external prismatic enamel (Fig. 8). In early secretory ameloblasts (Fig. 6), calbindin-D28k mRNA distribution was not regular throughout the cell body. A maximal concentration was detected in the distal part of the cell body.

### **Maturation Stage Ameloblasts (Plate 4)**

*In situ* hybridization with antisense probes provided a high signal in maturation stage ameloblasts at least during the early maturation. Later stages of enamel formation were not satisfactorily sectioned (Fig. 9). This stage was therefore chosen to illustrate the absence of labelling with sense riboprobes (Fig. 10). The mRNAs (Fig. 9) were

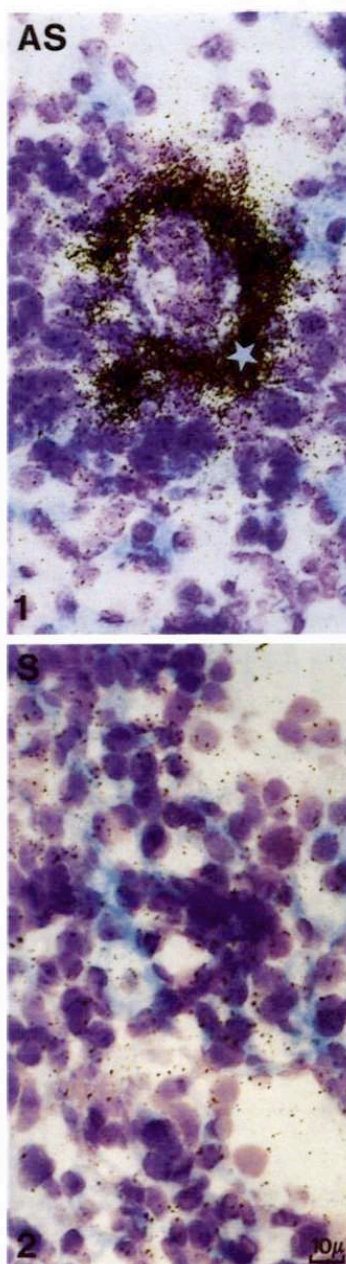


FIGURE 1 Calbindin-D28k antisense probes (AS) in the distal convoluted tubule of rat kidney ( $\times 660$ ). mRNAs detected in the clear cells (asterisk).

FIGURE 2 Calbindin-D28k sense probes (S) in a serial section of the kidney. ( $\times 660$ ). Uniform distribution of background.

distributed in the whole cytoplasm and the nucleus. The labelling in the maturation ameloblast layer was irregular, with staining of groups of ameloblasts.

## DISCUSSION

*In situ* hybridization on teeth sections has mainly been applied to two fields of investigation: developmental biology (concerning for instance, Hox-7 and Hox-8,<sup>10</sup> BMP-4<sup>11</sup> or, TGF $\beta$ <sup>12</sup>) and mesenchymal mineralization (concerning for instance collagens,<sup>13,14</sup> osteonectin,<sup>15</sup> or BSP<sup>16</sup>). Less attention has been paid to enamel formation.<sup>17</sup> In mineralized tissues, pretreatment with decalcifying agents is required for easier sectioning and has been reported not to interfere with *in situ* detection of various mRNAs.<sup>13,18</sup> However, after EDTA immersion, the background levels in our control negative cells were similar to the presumed signal in cells which express calbindins. These negative data show that the decalcification process actually interferes with *in situ* mRNA investigations. Extraction of ribo-nucleo-protein complexes may occur in the cytoplasm as shown previously for the cytosolic protein calbindin-D28k for ameloblasts.<sup>19</sup> Therefore, *in situ* mRNA labelling unfortunately had to be performed on undecalcified cryostat-sectioned samples, as previously done for bone matrix protein transcripts in resin-embedded adult rat bone.<sup>20</sup>

Ameloblasts elaborate enamel mineralized matrix in three steps: presecretory, secretory and maturation stages. Amelogenesis, therefore, requires an ordered sequence of elaboration for matrix proteins/proteases (for review<sup>21</sup>) and for molecules specialized in the control of calcium influx in enamel matrix (for review<sup>22</sup>). This sequence of events has been mainly investigated at the protein level either *in situ* or biochemically. In order to investigate this developmental pattern at the level of mRNAs throughout amelogenesis, the present study analyzed the variations of mRNAs encoding calbindin-28k, a calcium-binding protein involved in cellular calcium pathways.<sup>23</sup> Two maximal steady-state levels for calbindin-D28k mRNAs were observed *in situ* during the presecretion and initiation of the maturation stage, respectively. *In situ* calbindin-D28k protein concentration<sup>19</sup> varied in parallel with mRNAs, but after a delay. This temporo-spatial difference between *in situ* visualization of mRNAs and the protein has also been described in chick enterocytes and might correspond to a transitory inefficiency of translation.<sup>20</sup> This delay could also indicate the lag time necessary for splicing of mRNAs and or nucleo-cytoplasmic migration of mature mRNAs, as the transcripts were also detected in the nucleus exclusively during these periods, and in significant amounts compared to processed cytoplasmic RNAs. These two maxima would therefore correspond to two

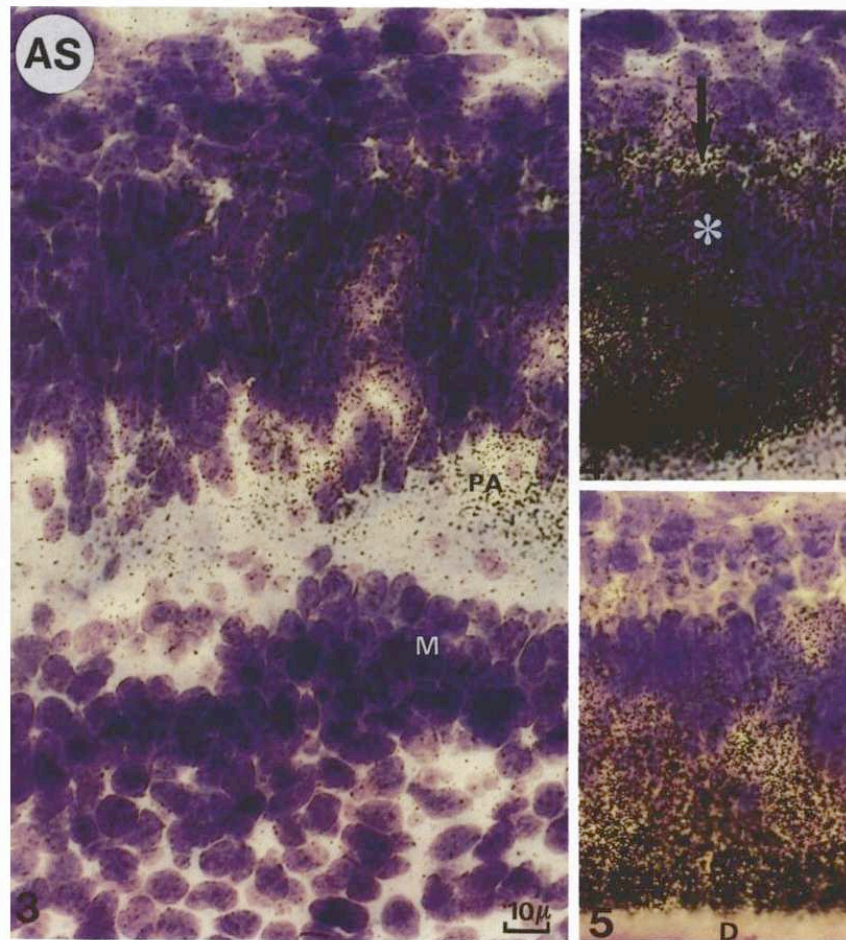


FIGURE 3 Low apparent levels of calbindin-D28k mRNAs in preameloblasts (PA) facing undifferentiated cells of the dental mesenchyme: (M). ( $\times 660$ ).

FIGURE 4 Calbindin-D28k mRNAs in presecretory stage ameloblasts. ( $\times 660$ ). The entire cytoplasm contains an intense signal, including the proximal area (black arrow). Nucleus also shows labelling (white asterisk).

FIGURE 5 Calbindin-D28k mRNAs in presecretory stage ameloblasts facing mineralizing mantle-dentine: (D). ( $\times 660$ ).

stages of the initiation of calbindin-D 28k gene transcription. The major constituents of forming enamel matrix, the amelogenins, have also been studied (for review<sup>21</sup>). This group of proteins appears early in the presecretory stage and reaches higher levels during the secretory stage. Some immunolabelled proteins are still detected in the maturation stage. A complex pattern of alternative splicing of their mRNAs<sup>24,25</sup> is observed in many species which might be stage-specific.<sup>26</sup> Therefore, this suggests

that two successive developmental pulses of transcription would control gene expression in ameloblasts.

Molecular determinants for the control of ameloblast gene expression in this first pulse of transcription have been extensively studied. It corresponds to the epigenetic cascade of epithelio-mesenchymal interactions<sup>11</sup> leading to a position- and time-specific terminal differentiation and activity of the secretory ameloblasts (amelogenin synthesis<sup>17</sup>). Indeed, amelogenin expression in the enamel

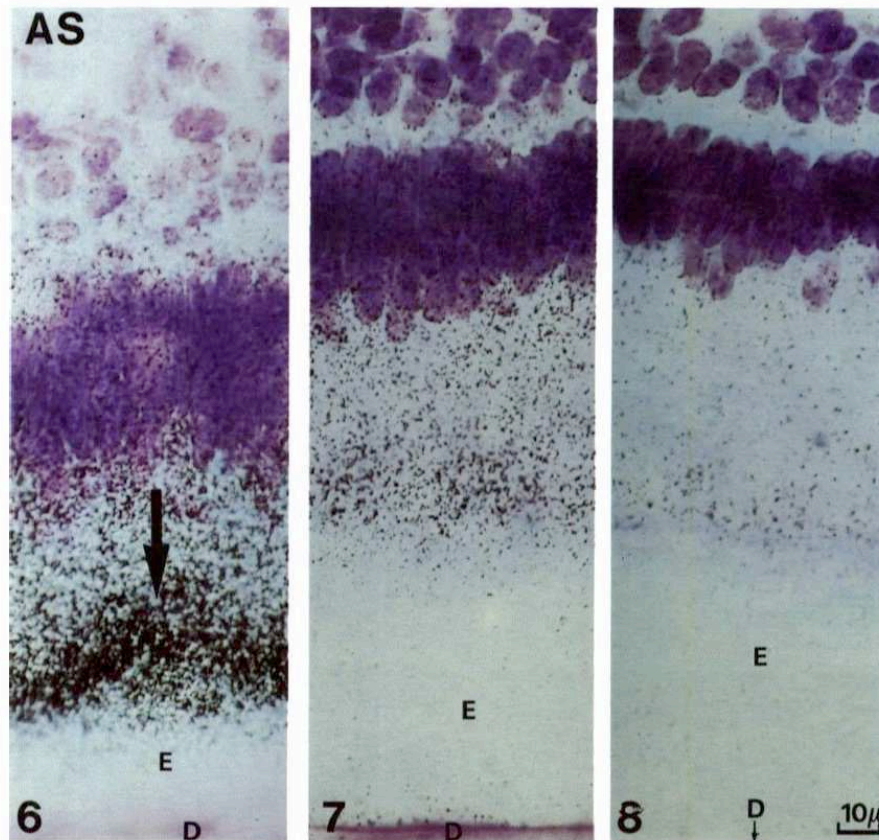


FIGURE 6 Ameloblasts which secrete the initial layers of inner prismatic enamel (E;  $\times 660$ ). Maximal apparent concentration of calbindin-D28k mRNAs in the distal part of the cell body (black arrow). Dentine: (D).

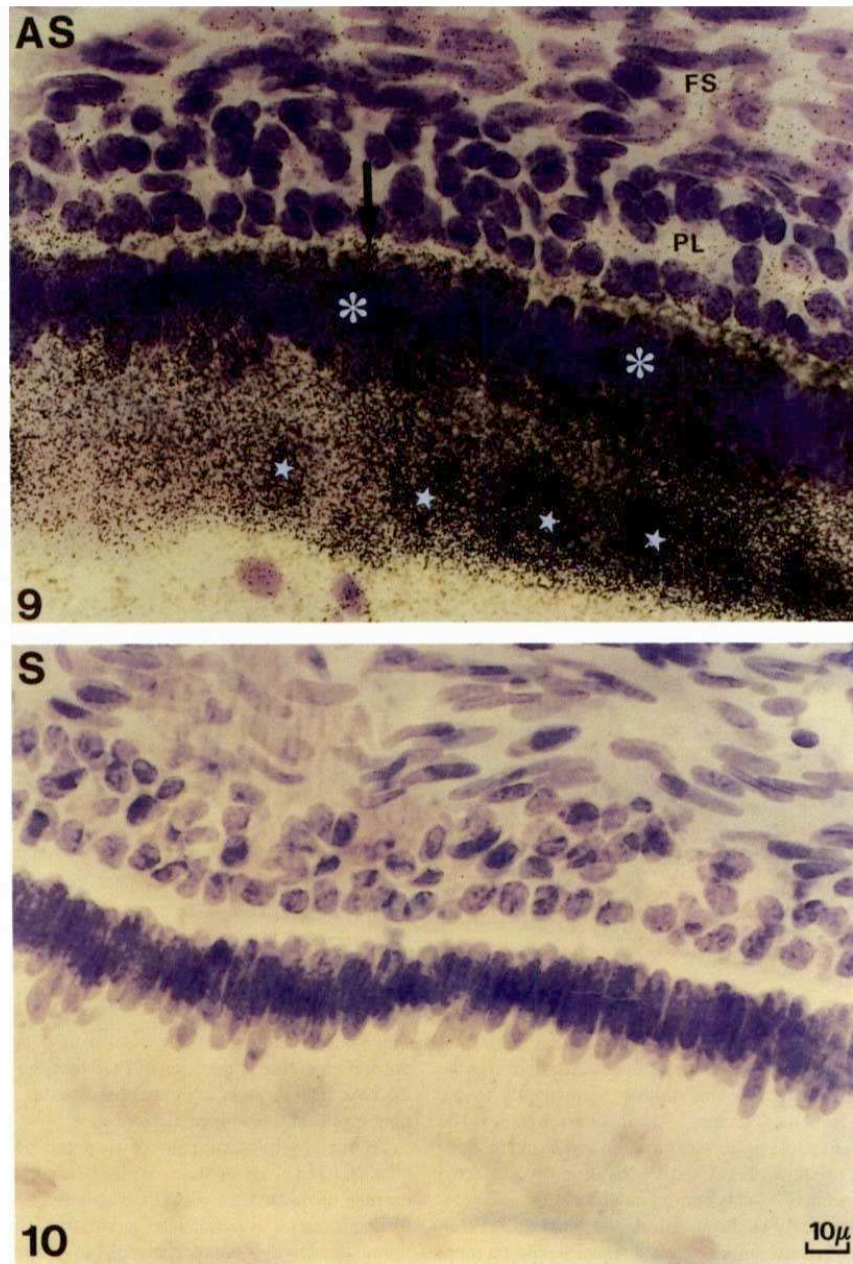
FIGURE 7 Ameloblasts which secrete the last layers of inner prismatic enamel (E;  $\times 660$ ). Dentine: (D).

FIGURE 8 Ameloblasts which secrete the layers of external prismatic enamel (E;  $\times 660$ ). Dentine is present underneath: (D).

organ is induced by recombination with the dental papilla.<sup>27</sup> In contrast, the second pulse of transcription in the already differentiated ameloblasts corresponds to the transition from the secretory to the maturation stages. The trigger for ameloblast gene expression activation (calbindin-D28k as shown here) and inactivation (as suspected for amelogenins<sup>21,26</sup>) may correspond to an intrinsic ameloblast program. By analogy with the terminal differentiation, the hypothesis of an external signal would be more likely. It could be derived from the adjoining matrix and be a specific fragment of cleaved amelogenins and/or a non amelogenin peptide (for review<sup>28</sup>). Another signal could be the modification of the ionic composition related to critical stages of apatite crystal growth (for review<sup>21</sup>).

Since this developmental stage is also associated with an apparent increase in the level of EGF receptor<sup>29</sup> and their mRNAs (Davideau *et al.*, unpublished data), EGF could play a role in this epigenetic sequence.

From a physiological point of view, this period is also characterized by an increase of calcium incorporation into enamel, related to  $\text{Ca}^{++}$ -ATPase activity.<sup>30,31</sup> This activity does not exactly parallel the variations of  $\text{Ca}^{++}$  pump immunoreactivity<sup>32</sup> but parallels the variations of cytosolic calbindins.<sup>7,32</sup> The increase in calbindin-D28k mRNAs could therefore constitute a preparatory step for ameloblasts to cooperate with calcium-transporting enzymes as in kidney cells.<sup>23</sup> The temporo-spatial variation of the expression of the second calbindin-D, calbindin-D9k,



**FIGURE 9** Maturation stage ameloblasts ( $\times 660$ ). Antisense riboprobes (AS) provide a strong signal in the whole cytoplasm including the proximal area (arrow) and are irregularly distributed in groups of ameloblasts (small asterisk). mRNAs (big asterisk) in the nuclei. Dental follicular sac (FS) and papillary layer (PL) are not labeled.

**FIGURE 10** Control section with a sense probe (S) shows little, if any hybridization labelling. ( $\times 660$ ).

would indicate the developmental specificities of the activated enzymes for each calbindin-D, as shown in kidney cells.<sup>23,33</sup>

#### ACKNOWLEDGMENTS

This study was funded by Inserm grants (Inserm U.120, J. Eljon) and the financial support of the laboratories Crinex (J. F. Gimenez).

#### REFERENCES

- Perret, C., L'Horset, F., and Thomasset, M. (1991). *Gene* **108**, 227.
- Dupret, J. M., L'Horset, F., Perret, C., Bernaudin, J. F., and Thomasset, M. (1992). *Endocrinology* **134**, 2643.
- L'Horset, F., Blin, C., Colnot, S., Lambert, M., Thomasset, M., and Perret, C. (1993). *Endocrinology* **134**, 11.
- Berdal, A., Hotton, D., Pike, J. W., Mathieu, H., and Dupret, J. M. (1993). *Dev. Biol.* **155**, 172.
- Warembourg, M., Perret, C., and Thomasset, M. (1986). *Endocrinology* **119**, 176.
- Kiyama, H., Wu, J. C. Y., Smith, M. W., Lawson, E. D. M., and Emson, P. C. (1991). *Differentiation* **46**, 69.
- Berdal, A., Hotton, D., Kamyab, S., Cuisinier-Gleizes, P., and Mathieu, H. (1991). *Arch. Oral Biol.* **36**, 715.
- Lebargy, F., Bullet, F., Siegrist, S., Guillain, G., and Bernaudin, J. F. (1990). *Lab. Invest.* **62**, 731.
- Lomri, N., Perret, C., Gouhier, N., and Thomasset, M. (1989). *Gene* **80**, 87.
- MacKenzie, A., Mark, W. J., Ferguson, J., and Sharpe, P. T. (1992). *Development* **115**, 403.
- Vainio, S., Karanowa, I., Jowett, A., and Thesleff, I. (1993). *Cell* **75**, 45.
- Heikinheimo, K., Happonen, R. P., Miettinen, P. J., and Ritvos, O. (1993). *J. Clin. Invest.* **91**, 1019.
- Lukinmaa, P. J. L., Vahtokari, A., Vainio, S., Sandberg, M., Walimo, J., and Thesleff, I. (1993). *Matrix* **13**, 503.
- Andujar, M. B., Couble, P., Couble, M. L., and Magloire, H. (1991). *Development* **111**, 691.
- Mundlos, S., Schwahn, B., Reichert, T., and Zabel, B. (1992). *Histochem. Cytochem.* **40**, 283.
- Chen, J., Shapiro, H., and Sodek, J. (1992). *J. Bone Min. Res.* **8**, 987.
- Snead, M. L., Luo, W., Lau, E. C., and Slavkin, H. C. (1988). *Development* **104**, 77.
- Walsh, L., Freemont, A. J., and Hoyland, J. A. (1993). *Int. J. Experimental. Pathol.* **74**, 237.
- Berdal, A., Nanci, A., Smith, C. E., Ahluwalia, J. P., Thomasset, M., Cuisinier-Gleizes, P., and Mathieu, H. (1991). *Anat. Rec.* **230**, 149.
- Ikeda, T., Nomura, S., Yamaguchi, A., Suda, T., and Yoshiki, S. (1992). *J. Histochem. Cytochem.* **40**, 1079.
- Nanci, A., and Smith, C. E. (1992). *Calcification in Biological System*, CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 313-343.
- Bawden, J. W. (1989). *Anat. Rec.* **224**, 226.
- Bouhtiany, D., Lajeunesse, S., Christakos, S., and Brunette, M. G. (1994). *Kidney Int.* **45**, 461.
- Shimokawa, H., Sobel, M. E., Sasaki, M., Termine, J. D., and Young, M. F. (1987). *J. Biol. Chem.* **262**, 4042.
- Bonass, W. A., Robins, P. A., Kirkham, J., Shore, R. C., and Robinson, C. (1994). *Biochem. Biophys. Res. Com.* **198**, 2.
- Den Besten, P. K., and Li, S. (1992). *Arch. Oral Biol.* **37**, 1097.
- Amar, S., Luo, W., Snead, M. L., and Ruch, J. V. (1989). *Differentiation* **41**, 56.
- Brookes, S. J., Robinson, C., Kirkham, J., and Bonass, W. A. (in press).
- Martineau-Doizé, B., Warshawsky, H., Dickson, K., Lai, W. H., and Bergeron, J. J. M. (1991). *Dev. Biol.* **148**, 590.
- Salama, A. H., Moneim, A. E., Zaki, E., and Eisenmann, D. R. (1987). *J. Histochem. Cytochem.* **35**, 471.
- Takano, Y., Matsuo, S., Wasikawa, S., Ichikawa, H., Nishikawa, S., and Akai, M. (1987). *J. Dent. Res.* **66**, 1702.
- Borke, J. L., Zaki, A. E. M., Eisenmann, D. R., Ashrafi, S. H., Ashrafi, S. S., and Penniston, J. T. (1993). *J. Histochem. Cytochem.* **41**, 175.
- Bouhtiany, D., Lajeunesse, D., Christakos, S., and Brunette, M. G. (1994). *Kidney Int.* **45**, 469.

## V.A.2. ARTICLE 2

**HOTTON D., MAURO N., LEZOT F., FOREST N., BERDAL A.** *Differential Expression and Activity of Tissue-nonspecific Alkaline Phosphatase (TNAP) in Rat Odontogenic Cells in Vivo. The Journal of Histochemistry and Cytochemistry, 1999.*

Cet article est consacré à la phosphatase alcaline tissu-non spécifique (TNAP) dans les tissus dentaires minéralisés. La phosphatase alcaline est connue pour s'exprimer dans différents types et régions cellulaires (vésicules matricielles, ostéocytes) qui jouent un rôle prépondérant dans la formation des tissus minéralisés.

Dans les tissus minéralisés dentaires, elle avait déjà été détectée dans des études par immunocytochimie (Gomez et Boyde, 1994) dans les améloblastes de mandibule de rat au stade de maturation.

Ce deuxième article a consisté en une analyse suivie de l'ARN au peptide, à la forme active de l'enzyme de la TNAP, par l'analyse semi-quantitative des ARNm en Northern blotting ainsi que des études par hybridation *in situ* (HIS), par immunomarquage de la protéine, par des mesures de l'activité phosphohydrolase de la TNAP sur l'épithélium et l'ectomésenchyme microdisséqués. Toutes ces études furent réalisées sur notre modèle de l'incisive à croissance continue non décalcifiée de rat âgé de 30 jours et de 56 jours.

Ces résultats prouvent que, dans les incisives de rongeur, la forme active de la phosphatase alcaline dans des dents, est la TNAP.

Les données obtenues permettent de visualiser les transcrits de la phosphatase alcaline présents en petite quantité dans les améloblastes présécréteurs. La transcription marque un arrêt dans les améloblastes sécréteurs pour reprendre ensuite au stade de maturation de l'émail. Le stratum intermedium est marqué tout au long du développement de l'incisive.

Alors que les schémas des ARNm et en histoenzymologie précédemment décrits étaient totalement superposables dans les cellules supra améloblastiques et dans les cellules mésenchymateuses, ils se révélèrent être différents dans les cellules sécrétant l'émail, les améloblastes en immunomarquage. La comparaison de nos résultats en HIS avec les résultats en immunocytochimie et en histoenzymologie par d'autres auteurs (Goseki et coll., 1995 ; Yuan et coll., 1995), nous a conduit à émettre l'hypothèse que la régulation de l'expression de ce gène pourrait se faire au niveau traductionnel dans les étapes de maturation.

Ceci correspond tout à fait à l'observation précédente pour la calbindine-D<sub>28K</sub>.

Comme montré pour des protéines impliquées dans les flux de calcium dans les améloblastes, un schéma biphasique de niveau d'expression des ARNm en fonction du stade de développement a été associé aux variations de niveau de protéines durant le processus de modulations cycliques de l'améloblaste.

Bien que l'association de la régulation positive de TNAP et de la phase initiale de la biominéralisation semble être un dispositif de base dans tous les tissus minéralisés, les améloblastes et à un moindre degré, les



odontoblastes ont montré une deuxième étape de régulation positive de l'activité de la phosphatase alcaline durant les phases de maturation tardive.

Cette expression et l'activité de la TNAP bimodale dans des dents versus l'os unimodal pourrait expliquer le phénotype dentaire comparativement à celui de l'os rapporté dans l'hypophosphatasie, une maladie héréditaire liée à la mutation de gène de la TNAP.

Ces résultats représentaient une première en terme de mise en évidence des transcrits de la TNAP par Northern blotting, de la mise en évidence de la protéine in situ par des anticorps et de l'activité de la protéine par dosage histoenzymologique, après microdissection des portions épithéliales et mésenchymateuses. Cette mise au point était intéressante par la qualité de reproductibilité des résultats permettant de valider le modèle ( $\Delta < 3\%$  en comparant les résultats obtenus entre mandibule droite et mandibule gauche), ainsi que par immunomarquage et hybridation in situ dans l'incisive non décalcifiée à croissance continue de rat âgé de 15 jours et 30 jours.

ARTICLE

## Differential Expression and Activity of Tissue-nonspecific Alkaline Phosphatase (TNAP) in Rat Odontogenic Cells In Vivo

Dominique Hotton, Nicole Mauro, Frédéric Lézot, Nadine Forest, and Ariane Berdal

Laboratoire de Biologie–Odontologie, Institut Biomédical des Cordeliers (DH,NM,FL,NF,AB), and INSERM U458 (DH), Paris, France

**SUMMARY** Among the four existing isoforms of alkaline phosphatase (AP), the present study is devoted to tissue-nonspecific alkaline phosphatase (TNAP) in mineralized dental tissues. Northern blot analysis and measurements of phosphohydrolase activity on microdissected epithelium and ectomesenchyme, in situ hybridization, and immunolabeling on incisors confirmed that the AP active in rodent teeth is TNAP. Whereas the developmental pattern of TNAP mRNA and protein and the previously described activity were similar in supra-ameloblastic and mesenchymal cells, they differed in enamel-secreting cells, the ameloblasts. As previously shown for other proteins involved in calcium and phosphate handling in ameloblasts, a biphasic pattern of steady-state TNAP mRNA levels was associated with additional variations in ameloblast TNAP protein levels during the cyclic modulation process. Although the association of TNAP upregulation and the initial phase of biomineralization appeared to be a basic feature of all mineralized tissues, ameloblasts (and to a lesser extent, odontoblasts) showed a second selectively prominent upregulation of TNAP mRNA/protein/activity during terminal growth of large enamel crystals only, i.e., the maturation stage. This differential expression/activity for TNAP in teeth vs bone may explain the striking dental phenotype vs bone reported in hypophosphatasia, a hereditary disorder related to TNAP mutation. (*J Histochem Cytochem* 47:1541–1552, 1999)

**KEY WORDS**

alkaline phosphatase  
bone  
dentin  
enamel  
mineralization  
vitamin D  
hypophosphatasia  
in situ hybridization  
immunolocalization

Alkaline phosphatases (APs) are ubiquitous in many species, from bacteria to human (Manes et al. 1990). Their overall distribution indicates that these enzymes perform important biological functions, particularly in mineralized tissues. However, the physiological role(s) of these isoenzymes is poorly understood. Four genes encode AP isoenzymes (Terao and Mintz 1987; Manes et al. 1990) in humans and rodents. Three AP genes are expressed in a tissue-specific manner (i.e., placental, embryonic, and intestinal AP isoenzymes). Expression of the fourth AP gene is non-specific to a single tissue and is especially abundant in bone, liver, and kidney. This isoenzyme is also called tissue-nonspecific alkaline phosphatase (TNAP) (Whyte

1994; Whyte et al. 1995). In rodents, the cDNAs encoding for the placental, embryonic, and intestinal isoenzymes of the mouse, and the TNAP isoenzyme of the rat (Noda et al. 1987, Thiede et al. 1988), have been isolated. TNAP isoenzyme in other species has been variably studied in bone and other mineralized tissues (Goseki et al. 1995; Yuan et al. 1995; Goseki–Sone et al. 1999). Hypophosphatasia due to a TNAP gene mutation is associated with a defective skeleton and, more specifically, premature loss of deciduous and permanent teeth (Whyte 1994). Null mutants for TNAP (TNAP  $-/-$ ) have been generated to provide an experimental system to analyze the features of human hypophosphatasia (Waymire et al. 1995). Surprisingly, null mutants do not show any gross defect of bone formation with vitamin B<sub>6</sub> rescue. The only mineralized system in TNAP  $-/-$  that could not be rescued was the forming incisors, especially enamel. This phenotype prompted us to reinvestigate TNAP in the continuously erupting rodent incisor.

Investigations of TNAP in the skeleton have been

Correspondence to: Dominique Hotton, Laboratoire de Biologie–Odontologie, EA 2380, UP7, Institut Biomédical des Cordeliers, 15–21 rue de l’Ecole de Médecine, 75006 Paris, France.

Received for publication February 23, 1999; accepted July 20, 1999 (9A4900).

mostly performed in bone and cartilage (Weinreb et al. 1990; Rodan and Noda 1991; Anderson and Morris 1993; Aubin et al. 1993; Hsu et al. 1993) in relation to its potential role in calcium and phosphate handling during biomineralization. Many histochemical studies have been devoted to teeth from the early 1950s until the present time (see review by Kurahashi and Yoshiki 1972; Deporter and Ten Cate 1976; Linde and Granström 1980; Orams and Snibson 1982; Gomez and Boyde 1994; Linde and Lundgren 1995; Takano 1995; Wöltgens et al. 1995). More recent investigations in the bovine enamel organ by cDNA isolation (Yuan et al. 1995), in human pulp (Goseki-Sone et al. 1999), and in the early stages of murine tooth formation by immunolabeling (Hoshi et al. 1997) and by *in situ* hybridization (Davideau et al. 1996) suggest that the AP previously detected by histochemistry in teeth was TNAP, as clearly established in bone (Noda et al. 1987; Thiede et al. 1988). These studies do not provide an overview of the temporospatial patterns of expression of mRNA and protein from early stages until complete enamel maturation. In this study, several methods of investigation were combined in the postnatal rat incisor. Northern blot analysis and measurements of enzymatic activity on microdissected epithelial and mesenchymal cells, *in situ* hybridization, and immunoperoxidase labeling were jointly performed. Our data show that TNAP mRNA and protein are effectively expressed in odontogenic cells and fluctuate differentially, supporting a prominent role for this enzyme during two critical phases, initiation and completion of dental biomineralization.

### Materials and Methods

Ten-day-old ( $n = 12$ ), 30-day-old ( $n = 18$ ), and 56-day-old ( $n = 30$ ) male Sprague-Dawley rats (Charles River; St Aubin les Elbeuf, France) were used for this study.

#### Tissue Preparation for RNA Investigation

The rats were decapitated after carbon dioxide asphyxiation, the mandibles were rapidly collected, and the alveolar bone was removed under a stereoscopic microscope. The incisor was extracted and the distinct epithelial and mesenchymal odontogenic cells were microdissected. The apical portion containing the odontogenic organ and the early mineralization zone of enamel and dentin was removed to ensure purity of epithelial and mesenchymal samples. Lateral cuts were made along the cemento-enamel junction and the enamel organ was scraped off the labial part of the incisor. Finally, the dental mesenchyme was collected. Dental samples and kidneys were maintained under liquid nitrogen. Epithelial and mesenchymal dissection procedures were validated by: (a) identification of enamel protein mRNA, *i.e.*, encoding amelogenins in epithelial cells and osteocalcin mRNA in mesenchymal cells (not shown) and (b) compara-

tive measurements of purified proteins and alkaline phosphatase activity in right and left incisors of the same animals.

#### Northern Blotting

Total RNA isolation was performed on 100–200 mg of microdissected tissue from 56-day-old rats with an RNA extraction kit (Euromedex; Souffelweyersheim, France). Total RNA was electrophoretically fractionated on a 1% agarose formaldehyde gel and transferred onto nylon membranes. Filters were prehybridized, hybridized with  $^{32}\text{P}$ -labeled rat TNAP cDNA (G.A. Rodan; Merck Research Laboratories, West Point, PA), washed, and autoradiographed, as previously described (Berdal et al. 1993). GAPDH mRNA was also investigated to verify the amounts of mRNA in each lane.

#### Measurement of AP Activity

The samples from 56-day-old rats were washed twice in 0.1 M PBS (Sigma; La Verpillière, France) and rinsed in 100 mM sodium carbonate-bicarbonate solution at pH 10.2. They were homogenized at 6000 rpm with a polytron homogenizer (Ultraturax; Ika, Germany) in a solution containing 0.1% Nonidet P 40 (Sigma) 1 mM  $\text{MgCl}_2$ , and sonicated at 4C. Lysates were removed by centrifugation at  $3000 \times g$  for 5 min. AP activity was determined in the supernatant. The enzymatic activity was expressed as nmol of *p*-nitrophenol (PNP) released per minute per mg of protein at 37C. AP phosphohydrolase activity was assessed by measuring PNP release from *p*-nitrophenolphosphate (PNPP) by absorbance spectrophotometry at 410 nm and compared with a PNP standard solution (Sigma). The reaction was carried out in 500  $\mu\text{l}$  of buffer solution (1.5 M 2-amino-2-methyl-1 propanol, pH 10.3, with 15 mM PNPP). After 15 min at 37C with 50  $\mu\text{l}$  of the tissue lysate supernatant, the reaction was stopped with 2 ml of 0.1 M NaOH. Protein concentrations were determined by Lowry's modified method (Lowry et al. 1951; Anagnostou et al. 1996) using bovine serum albumin as standard. Km values were determined by Lineweaver-Burk representations based on the use of various dilutions of the enzyme, various substrate concentrations (1, 2, 5, 10, and 15 mM), five reaction times (from 2 to 20 min), and five separate measurements.

#### Preparation of Incisor Samples for *In Situ* Hybridization and Immunolabeling

After barbital anesthesia, rats (10-, 30-, and 56-day-old) received an intracardiac infusion of 4% paraformaldehyde–15% sucrose in PBS (Sigma), pH 7.4, for 15 min. Mandibles were dissected out, fixed by immersion in the same fixative for 1 hr at 4C, and rinsed overnight in 15% sucrose–PBS at 4C. The mandibles were cut either without decalcification (left incisors) or after decalcification (right incisors). These latter were rinsed for 4 hr in PBS at 4C and decalcified for 4 weeks at 4C in PBS with 4.13% disodium ethylenediaminetetraacetic acid (Sigma) and 0.2% paraformaldehyde (Sigma) pH 7.4, dehydrated, and paraffin-embedded. Ten- $\mu\text{m}$  sections of dissected left incisors were made with a cryostat at  $-25\text{C}$  (MGW Lauda Leitz; Rockleigh, NJ). Sections were

deposited onto 50 mg/ml poly-L-lysine (Sigma)-coated slides and were then dehydrated in a graded ethanol series and stored at 4°C. The other sections (decalcified right incisors) were made with a paraffin microtome (Leica; Rueil Malmaison, France) and were deposited on silanized slides, deparaffinized, and rehydrated before use.

#### In Situ Hybridization

A 2.2-kb fragment of rat TNAP subcloned into Bluescript-SK<sup>+</sup> plasmid (gift from M. Vogel and G.A. Rodan; Merck Research Laboratories) was linearized with BamHI or PvuII endonucleases (Promega; Madison, WI). [<sup>35</sup>S]-UTP-labeled single-stranded antisense and sense probes were synthesized *in vitro* using T7 and T3 polymerases, respectively (Promega). *In situ* hybridization was performed as previously described (Hotton et al. 1995). Briefly, cryostat sections were pretreated with proteinase K (Sigma), hybridized with 20  $\mu$ l of labeled probes containing 60,000 cpm/ $\mu$ l radioactivity in a moist chamber overnight at 50°C, and washed under high-stringency conditions. The slides were dipped into NTB2 autoradiographic emulsion (Kodak; Paris, France) and exposed for 4 weeks at 4°C. After developing the film, sections were stained with Harris hematoxylin (Sigma), dehydrated, and mounted under a coverslip. Sections were examined and photographed with a Zeiss photomicroscope using bright- and darkfield illumination.

#### Immunocytochemical Procedures

Monoclonal murine primary antibodies specific for rat TNAP (M. Vogel and G. Rodan) were used. Paraffin sections were treated with 0.3% hydrogen peroxide in 0.1 M Tris-HCl, pH 7.6, for 10 min to inhibit endogenous peroxidase activity. After rinsing in Tris-HCl solution, the sections were incubated overnight in Tris-HCl containing 1:30 non-immune goat serum (Nordic; Tilburg, The Netherlands) to block nonspecific binding sites and were then incubated with serial dilutions of monoclonal rat TNAP antibodies (from 1:750 to 1:4000) for 2 hr at room temperature, rinsed in 1% Tris-HCl-bovine serum albumin (BSA), and incubated with biotinylated polyclonal rabbit anti-mouse secondary antibodies at a 1:100 dilution for 1 hr. After incubation in 1:300 diluted extravidin-peroxidase (Sigma) for 30 min, the immunoreactive sites were visualized by 3-3'-tetrachloride diaminobenzidine oxidation (Sigma), 5 mg/10 ml in 0.1 M Tris-HCl, pH 7.6, with 0.03% hydrogen peroxide. Sections were rinsed in Tris-HCl, dehydrated, and mounted in Depex (Gurr; OSI, France). Sections were lightly counterstained with Harris hematoxylin solution (Sigma). Irrelevant murine immunoglobulins (1:750–1:4000) were used as negative controls.

## Results

### Biochemical Investigations of Rat TNAP

The measurement of phosphohydrolase-specific activity of AP was realized in 56-day-old rat samples. This activity was consistently and significantly higher ( $p=0.006$ ) in microdissected mesenchyme ( $15,184 \pm 911$

nmol PNP/min at 37°C/mg proteins) than in epithelium ( $7145 \pm 214$  nmol PNP/min at 37°C/mg proteins). The reproductibility of microdissection procedures was established by the low variability between measurements (<3%) on paired left and right incisors of the same rat (Table 1). The  $K_m$  values for epithelial and mesenchymal samples were identical (2.1 mM).

Northern blot analysis was serially performed with TNAP and GAPDH probes using mRNA from two different portions of the tooth containing epithelial (EO) and mesenchymal (M) differentiated cells. The kidney (K) was used as the reference organ for rat TNAP. The transcripts (2.5 kb) expressed in dental epithelium and mesenchyme corresponded to that of the TNAP enzyme observed in the kidney (Figure 1).

### Distribution of TNAP mRNA and Protein in the Mandible

The forming alveolar bone (Figure 2) and adjoining cells of the follicular sac surrounding the incisor contained immunoreactive alkaline phosphatase. Progenitor and differentiated bone cells of the mandible (Figure 3) also consistently showed AP immunostaining, with an apparent decrease from early stages of osteoblasts/recently embedded osteocytes to the stages of older osteocytes. TNAP protein was present in both the cell membrane and cytoplasmic compartments of bone cells. Immunocontrols showed no labeling (Figure 4).

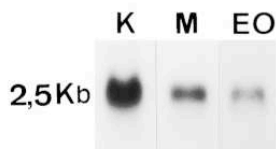
### Developmental Pattern of TNAP Protein and mRNA During Amelogenesis

The expression of TNAP mRNA and protein was analyzed in the incisor enamel organ (Figures 5–9 and 12). Similar data concerning the developmental patterns of AP mRNA and protein at the various ameloblast stages were obtained in 10-, 20-, and 56-day-old rat incisors. They are illustrated in the plates obtained from 56-day-old rats. The developmental pattern was followed from the presecretion stage (Figure 5) to the secretion (Figure 6) and maturation (Figures 7–9 and

**Table 1** Alkaline phosphatase activity in 56-day-old rat incisors (mean  $\pm$  SD)<sup>a</sup>

	Protein ( $\mu$ g)	ALP (nmol PNP/min at 37°C)	Specific activity (nmol PNP/min at 37°C mg protein)
Enamel organ (left)	223 $\pm$ 2.02	1658 $\pm$ 41.45	7435 $\pm$ 215
Enamel organ (right)	209 $\pm$ 0.22	1558 $\pm$ 41.43	7454 $\pm$ 201
Mesenchyme (left)	517 $\pm$ 4.84	7950 $\pm$ 146.25	15,377 $\pm$ 415
Mesenchyme (right)	585 $\pm$ 5.85	8666 $\pm$ 428.59	14,813 $\pm$ 873

<sup>a</sup>Enamel organ and dental mesenchyme were microdissected from right and left mandibular incisors of the same 56-day-old rats. Data shown were obtained for each sample from one rat. All measurements were done three times. This table illustrates the low measurement variations related to the microdissection procedures.

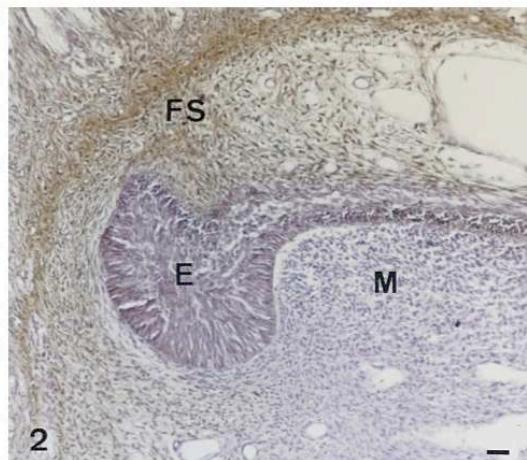


**Figure 1** Northern blot analysis of TNAP mRNA (20  $\mu$ g total mRNA) in kidney (K), microdissected dental mesenchyme (M), and enamel organ (EO). The molecular weight of TNAP mRNA was identical in all studied tissues (2.5 kb).

12) stages, ordered on the longitudinal axis of the samples. The apical loop that contains undifferentiated epithelial and mesenchymal cells was devoid of TNAP mRNA (not shown) and protein (Figure 2). At the end of the enamel presecretion stage, the TNAP transcripts were detected in presecretory ameloblasts and stratum intermedium cells (Figures 5A and 5B). TNAP mRNA expression persisted in stratum intermedium cells during the secretion stage, whereas TNAP mRNA dramatically decreased in secretory ameloblasts (Figures 6A and 6B). This distribution was observed throughout the secretion stage. Maturation stage ameloblasts showed progressively increasing apparent concentrations of TNAP transcripts from the transition phase (Figures 7A and 7B) to the first ameloblast modulation (not shown). The highest and apparently stable steady-state mRNA levels were then observed throughout the maturation stage (Figures 8A and 8B). The TNAP mRNA and protein distribution patterns were identical, except in the ameloblasts during the maturation stage. Ruffle-ended ameloblasts showed intense labeling during the modulation process, especially adjacent to the enamel matrix inside the ruffled border, in contrast with the smooth-ended ameloblasts, which were almost devoid of staining, at least on the smooth border (Figure 9). TNAP mRNA was detected in supra-ameloblastic cells with a decreasing gradient from the transition stage (Figures 7A and 7B) throughout the successive ameloblast modulation cycles, resulting in almost complete absence of mRNA in supra-ameloblastic cells (Figures 8A and 8B). The same pattern was observed for TNAP protein in supra-ameloblastic cells (Figure 9). Finally, immunostaining was also found in the extracellular enamel matrix bordering the apical pole of the ameloblasts in the maturation stage (Figure 10).

#### Expression of TNAP mRNA and Protein in Dentinogenic Cells

Consistent with the data obtained with TNAP antibodies, TNAP mRNA appeared to be present in the odontoblasts and subodontoblastic cells (Figures 5A and 5B), but the relative abundance of TNAP mRNA



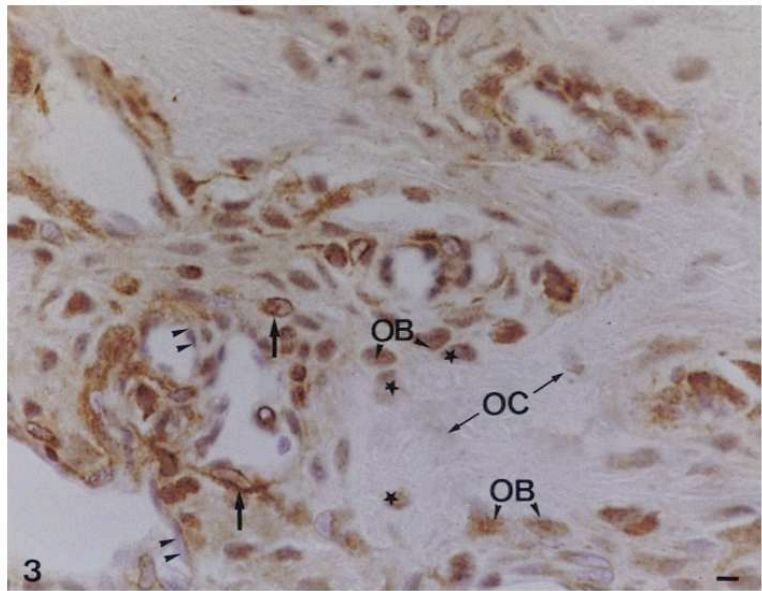
**Figure 2** Immunolocalization of AP in the apical loop of the enamel forming part of a 56-day-old decalcified rat incisor. Undifferentiated epithelial (E) and ectomesenchymal (M) cells of the rat incisor do not appear to contain immunoreactive AP. In contrast, the cells of the follicular sac surrounding the forming rat incisor react with the TNAP antibodies (FS). Bar = 12.2  $\mu$ m.

decreased in odontoblasts with the progressive deposition and biomineralization of mantle dentin followed by orthodontin. TNAP protein immunolabeling was present in the cell membrane of odontoblasts and subodontoblastic cells (Figure 11). Immunostaining was distributed in the cytoplasmic compartment and plasma membrane, from the supranuclear area to the secretory pole of odontoblasts. As observed in osteoblasts and epithelial cells, the nuclei of odontoblasts and subodontoblastic cells were devoid of labeling (Figure 11). The extracellular signal evidenced by serial dilutions of TNAP antibodies in the predentin–dentin border (1:1000 dilution, Figure 12 vs 1:750 dilution, Figure 11) became progressively more obvious, suggesting enrichment of TNAP epitopes in this extracellular zone compared to the intracellular compartments. Such an effect of TNAP antibody dilution was also observed for the extracellular labeling of enamel matrix (Figure 10).

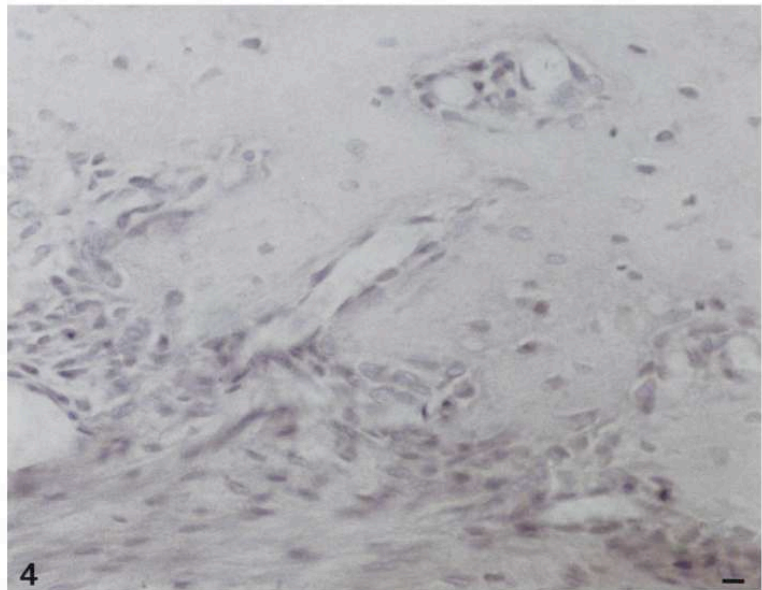
#### Discussion

This study was devoted to the comparative investigation of AP protein and mRNA in three different mineralized tissues: the best characterized bone, used as a reference system, as well as enamel and dentin, which have previously been mainly investigated separately by enzymatic methods, as many studies have been devoted to the fine analysis of AP activity by light and electron microscopy of bone and teeth (for reviews see

**Figure 3** Immunolocalization of TNAP in a decalcified woven bone located underneath the anterior third of the incisor of a 56-day-old rat mandible. Forming endosteum contains mixed immunonegative (double arrowheads) and immunopositive cells (black arrow). Alkaline phosphatase is localized in the differentiating osteoblasts (OB). Young osteocytes (black star), recently embedded in the woven bone, are immunoreactive, whereas older osteocytes in the central part of bone matrix (OC) do not contain a significant amount of immunoreactive alkaline phosphatase. Bar = 1.2  $\mu$ m.

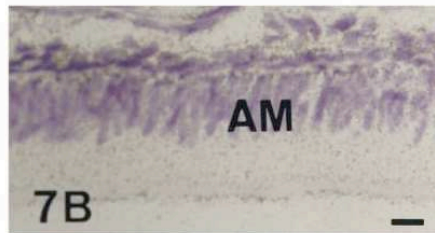
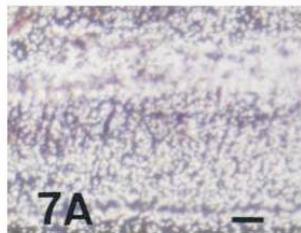
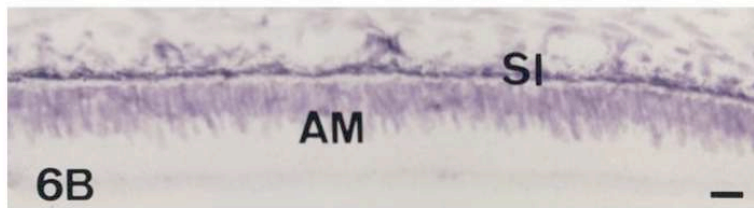
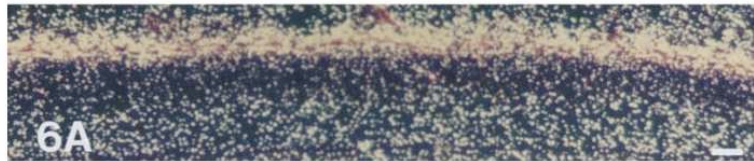
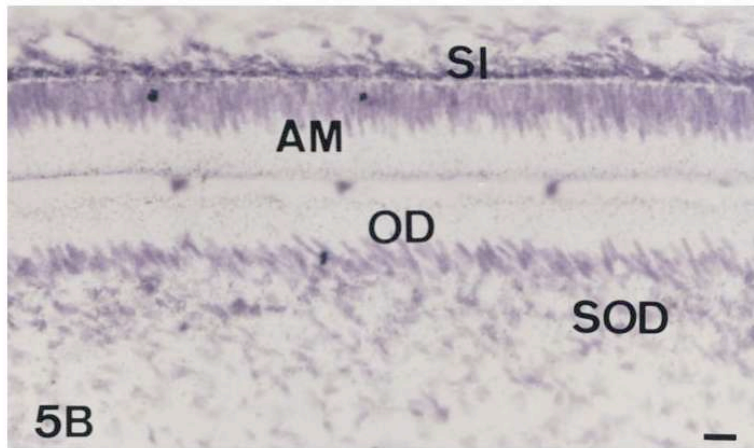


**Figure 4** Control with irrelevant antibodies in the forming mandible on a serial section of the 56-day-old decalcified rat incisor. Bar = 1.2  $\mu$ m.



Kurahashi and Yoshiki 1972; Deporter and Ten Cate 1976; Linde and Granström 1980; Orams and Snibson 1982; De Bernard et al. 1986; Takano et al. 1986; Bonucci et al. 1992; Gomez and Boyde 1994; Linde and Lundgren 1995; Wöltgens et al. 1995). TNAP immunolabeling has been previously performed during the first steps of amelogenesis and dentinogenesis

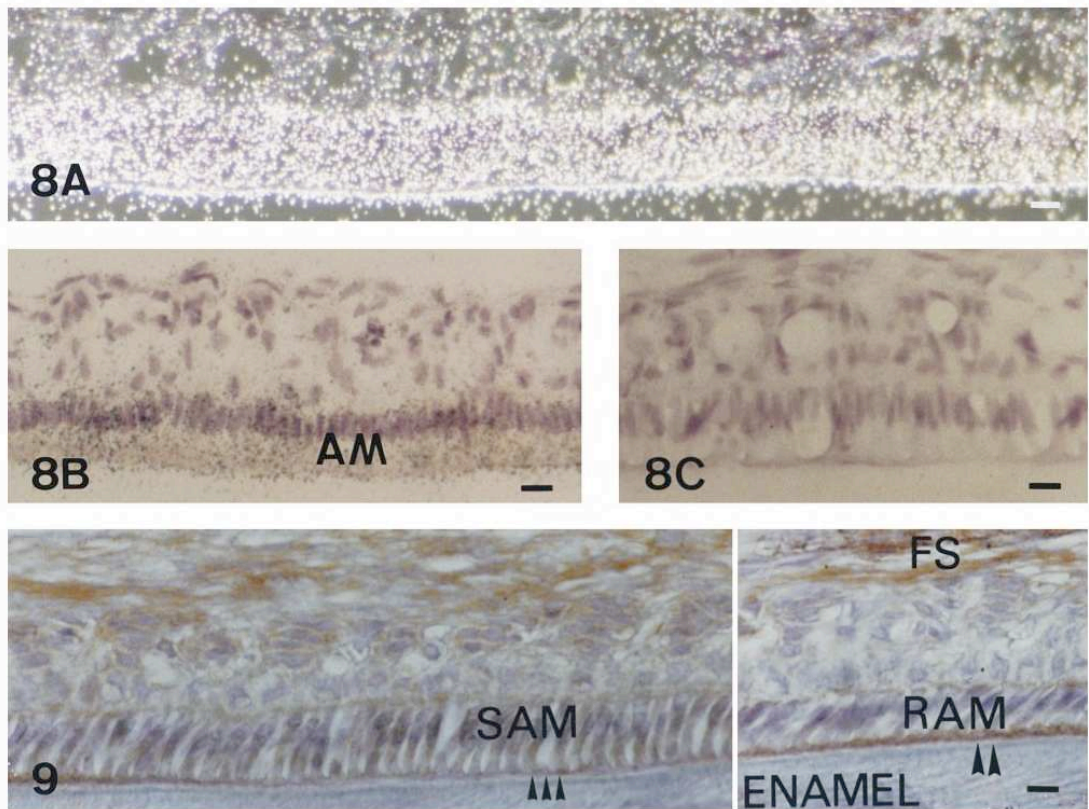
(Hoshi et al. 1997), whose data are consistent with our study. The findings of present experiment, exploring the overall distribution pattern of TNAP protein during dentinogenesis and the sequence of presecretion/secretion/maturation stages of amelogenesis, are also consistent with published distributions of AP activity. The respective distributions of AP protein and



**Figure 5** In situ hybridization with AP antisense riboprobe of a 56-day-old undecalcified rat incisor, dark- (A) and brightfield (B) views. In the region of the presecretion stage of enamel formation, ameloblasts (AM) show many transcripts for AP but less than supra-ameloblastic cells of the stratum intermedium (SI). In the region of the formation of the mantle dentin, AP transcripts are present at high levels in odontoblasts (OD) and subodontoblastic cells (SOD). Bar = 6.1  $\mu$ m.

**Figure 6** In situ hybridization with AP antisense riboprobe of a 56-day-old undecalcified rat incisor in the region of the secretion stage of enamel formation, dark- (A) and brightfield (B) views. Ameloblasts (AM) are almost devoid of transcripts, in contrast to a specific subpopulation of supra-ameloblastic cells, the stratum intermedium (SI). Bar = 6.1  $\mu$ m.

**Figure 7** In situ hybridization with AP antisense riboprobe of a 56-day-old undecalcified rat incisor in the region of the transition stage of enamel formation, dark- (A) and brightfield (B) views. Labeling in ameloblasts (AM) increases during the transition phase and stays homogeneous throughout the maturation process. Supra-ameloblastic cells still show a significant signal. Bar = 3  $\mu$ m.



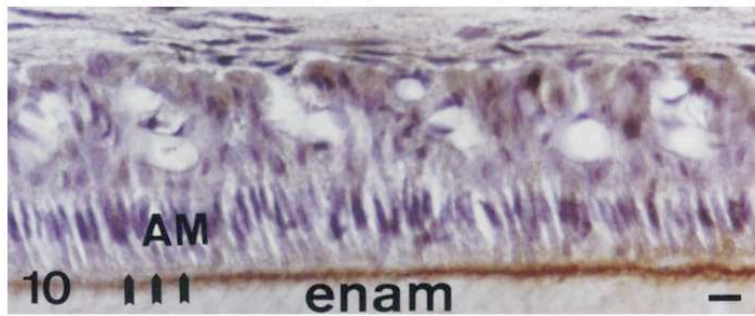
**Figure 8** In situ hybridization with AP antisense riboprobe of a 56-day-old undecalcified rat incisor in the region of the late maturation stage of enamel formation, dark- (A) and brightfield (B,C) views. Labeling inside ameloblasts (AM) is still homogeneous and significant throughout maturation until the latest stages shown here, but no positive cells are detected in the supra-ameloblastic cells at these stages. In situ hybridization with AP sense riboprobe on the serial section is devoid of signal (C). Bars = 3  $\mu$ m.

**Figure 9** AP immunolabeling in a 56-day-old decalcified rat incisor in the region of the late maturation stage of enamel formation. The follicular sac (FS) is heavily labeled. The maturation stage ameloblasts show various morphologies. The smooth-ended ameloblasts (SAM) are characterized by a smooth border and wide intercellular spaces (triple arrows). The ruffle-ended ameloblasts (RAM) show a wide apical border which corresponds to the ruffled border adjacent to the enamel matrix (double arrowheads). The same TNAP pattern is observed throughout the modulation cycles. Immunostaining is shown during the third modulation cycle. It appears strikingly different, depending on ameloblast morphology. Very significant labeling is mainly associated with the ruffled border in RAM. The labeling is weak in SAM. Bar = 3  $\mu$ m.

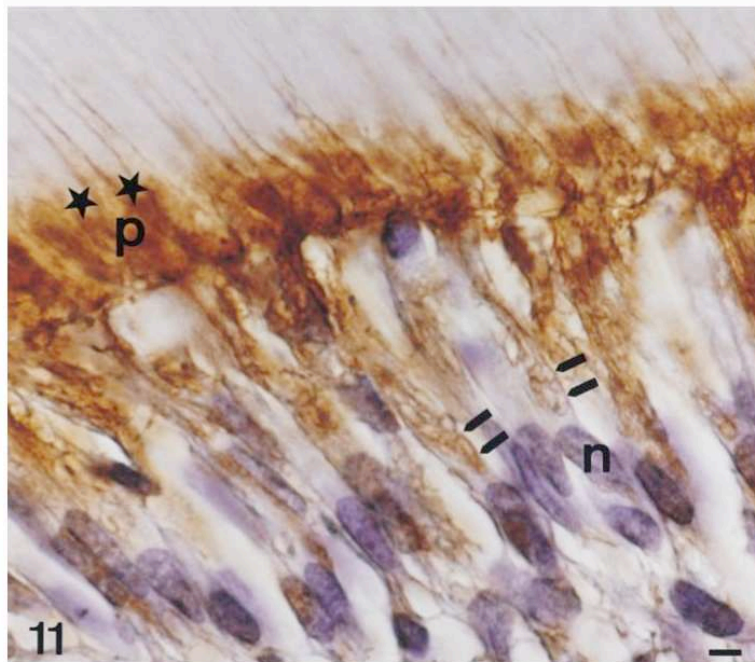
activity in enamel and dentin were identical, in contrast with cartilage, where the protein detected was either enzymatically inactive or active in the extracellular compartment, depending on the stage of biomineralization (De Bernard et al. 1986). In bone, TNAP protein was not associated with a distinct extracellular structure, as described previously (Pinerio et al. 1995). The further results obtained here by comparative enzymology and Northern blot analysis established that the AP expressed in rat teeth is the tissue-nonspecific alkaline phosphatase (TNAP), as previously suggested (Hoshi et al. 1997) and demonstrated in bovine (Yuan et al. 1995) and human species (Goseki-Sone et al.

1999). Quantitative methods also showed that the enzyme activity was related to the steady-state level of mRNAs: higher in mesenchyme than in the enamel organ. Similarly, in primary cell culture systems, the AP activity (Collin et al. 1992) and mRNA steady-state level (Stein et al. 1998) varied in parallel during the stages of osteoblast proliferation, differentiation, and bone mineralization. The observed patterns for mRNA and protein in bone tissue *in vivo* shown here were consistent with the concept established *in vitro* that AP is intensely expressed during terminal differentiation of osteoblasts and initial biomineralization and decreases when bone mineralization has been achieved.

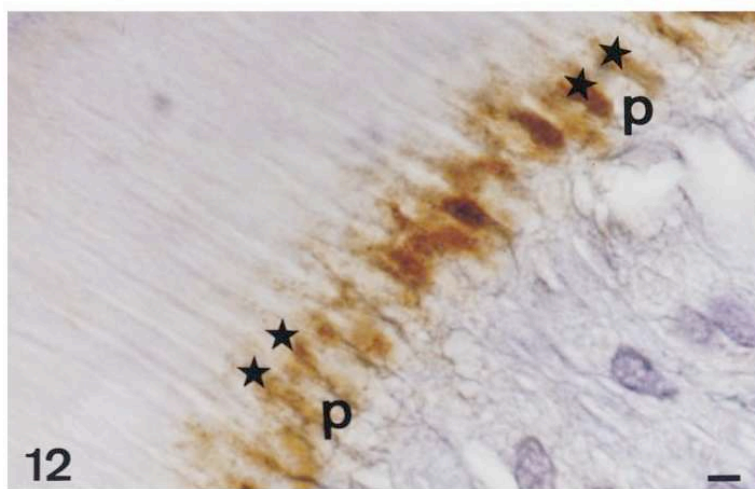




**Figure 10** AP immunolabeling in a 56-day-old decalcified rat incisor in the region of the maturation stage of enamel formation; 1:1000 dilution of primary antibodies. During the first modulation, at this dilution the extracellular compartment contains an immunolabeled border facing the ruffle-ended ameloblasts. Triple arrows, ruffled borders; AM, ameloblasts; enam, enamel. Bar = 3  $\mu$ m.



**Figure 11** AP immunolabeling in a 56-day-old decalcified rat incisor in the region of mineralization of intercanalicular dentin in the area corresponding to enamel maturation stage; 1:750 dilution of primary antibodies. Immunolabeling is detected in the cytoplasm and the plasma membrane (double arrows) of odontoblasts (OD) and subodontoblastic cells (SOD). In the extracellular compartment, the predentin-dentin junction is also immunolabeled (star). Surrounding cellular process, p; noyau, n. Bar = 1.2  $\mu$ m.



**Figure 12** AP immunolabeling in a 56-day-old decalcified rat incisor in the region of mineralization of intercanalicular dentin on a serial section of that shown on Figure 11; 1:1000 dilution of primary antibodies. Staining at the predentin-dentin border (star) was the last to be visualized on serial dilutions. At this dilution, the odontoblast processes are less labeled inside the cytoplasm. This appears clearly when the processes are longitudinally sectioned, surrounded by extracellular TNAP labeling. Odontoblast process, p. Bar = 1.2  $\mu$ m.

This finding was particularly marked in young rather than old osteocytes. In contrast, during the processes of enamel and dentin formation, initiation of biomineralization was associated not only with upregulation of alkaline phosphatase mRNA/protein/activity in the cells in contact with extracellular matrix (main cells: ameloblasts and odontoblasts, respectively) but also with the subsequent steps of biomineralization. This dental specificity, a biphasic pattern in the main cells, could partly explain the striking phenotype of incisors in TNAP null mutants compared to the bone phenotype (Whyte et al. 1995).

The developmental pattern of AP mRNA, protein (as shown here), and enzymatic activity (see review by Kurahashi and Yoshiki 1972; Deporter and Ten Cate 1976; Linde and Granström 1980; Orams and Snibson 1982; Gomez and Boyde 1994; Linde and Lundgren 1995; Takano 1995; Wöltgens et al. 1995), although identical in ectomesenchymal and supra-ameloblastic cells, differed significantly in the main cells of the enamel organ, ameloblasts. AP mRNA expression was characterized by a biphasic pattern in which two optimal phases were detected, one at the presecretion stage, as previously shown for enzymatic activity (Takano et al. 1986), and the other at the maturation stage, when AP activity reached its highest levels (Gomez and Boyde 1994). An additional modulation of AP protein (this study)/activity (Gomez and Boyde 1994) levels was demonstrated in maturation stage ameloblasts. These data may correspond to selective functions of ameloblasts throughout the successive steps of amelogenesis (Nanci and Smith 1992). Amelogenesis is a complex process, in which the matrix is elaborated and mineralized during two distinct stages. During the secretion stage, enamel matrix is synthesized and exported, and biomineralization is initiated (Smith et Nanci 1995). When the full thickness of extracellular matrix has been achieved, the maturation stage involves selective proteolysis of matrix proteins and completion of hydroxyapatite crystal growth (Robinson et al. 1995). Several gene/protein expression patterns have been described throughout enamel formation, concerning matrix proteins, such as amelogenins, tuftelin (for review see Zeichner-David et al. 1995), amelin/ameloblastin/sheathlin (Cerny et al. 1996; Krebsbach et al. 1996), enamelin (Hu et al. 1997), and matrix proteases (Bègue-Kirn et al. 1998). More recently, several reports (Bègue-Kirn et al. 1998; Fong et al. 1998; Ritchie et al. 1998) have indicated that enamel proteins are expressed in early odontoblasts, while dentin proteins and their corresponding mRNAs are detected in a mirror configuration in presecretory ameloblasts. Interestingly, this lag time corresponds to the period when AP is jointly and transiently co-expressed in ameloblasts and odontoblasts, as clearly demonstrated here by *in situ* hy-

bridization. It can therefore be hypothesized that enamel and dentin proteins are jointly controlled by signaling pathways common to epithelial and ectomesenchymal cells during this critical period, in which dentin and enamel matrix are shared, not yet separated by the formed mineral. Interestingly, this period corresponds to the initiation of enamel/dentin biomineralization which might be interdependent and mediated by mechanisms unrelated to the subsequent stages of separate enamel (Robinson et al. 1995; Nanci and Smith 1992) and dentin formation. For example, it has been established that matrix vesicles are temporarily present in mantle dentin (Linde and Goldberg 1993). Interestingly, concerning the role of TNAP in cartilage matrix vesicles (De Bernard et al. 1986), in our experiment TNAP mRNA was significantly expressed in odontoblasts facing dentin-containing matrix vesicles.

Odontogenic cells synthesize a set of molecules involved in the control of calcium and phosphate bioavailability, presumably useful for nucleation and growth of apatite crystals (see review by Takano 1995), such as calbindin-D9k and calbindin-D28k (Berdal et al. 1996), parvalbumin (Davideau et al. 1993), calcium-ATPase (Borke et al. 1995), and alkaline phosphatase (see review by Takano 1995; and this study). As observed here for AP, the developmental expression patterns of calbindin-D9k, calbindin-D28k (Berdal et al. 1991; Hotton et al. 1995), and parvalbumin (Davideau et al. 1993) have been shown to be based on a biphasic mode concerning the steady-state levels of mRNA and additive cyclic modulations concerning the cytoplasmic levels of proteins during the maturation stage in the incisor. Whether these cellular fluctuations of protein levels are related to variations in the synthesis and/or proteolytic processing in the ruffle- and smooth-ended ameloblasts remains to be investigated. Unfortunately, the rather small quantities of dental epithelial cells that can be used for biochemical investigations *in vivo* or *in vitro* further limit such investigations. However, the reliability of the rat incisor sampling methods for biochemical investigations was confirmed in our study, a technical aspect that validates our experimental strategy using this system to investigate gene/protein up- and downregulation by hormones and growth factors in the overall process of tooth formation (see review by Berdal 1997). The EGF receptor pathway may presumably contribute to the presently established fine-tuned intracellular protein levels for AP and previously established for other calcium binding proteins, as suggested by the observed variations of EGF receptors (full-length and truncated forms) in the same experimental system (Davideau et al. 1995).

The present cellular and tissue distribution of immunoreactive AP is consistent with the proposed path-

ways for AP synthesis and processing (Van Hoof and De Broe 1994). AP presents several isoforms. A form anchored to the membrane via a glycosyl-phosphatidylinositol domain has been shown to be enzymatically active in osteoblasts in vitro (Anagnostou et al. 1996). On the other hand, a cleaved AP, either active or inactive as assessed by histoenzymology (De Bernard et al. 1986), is present in the extracellular milieu, including the serum compartment (Van Hoof and De Broe 1994). Previous immunolocalizations and the present study have been performed in bone (Bonucci et al. 1992) and cartilage (De Bernard et al. 1986). The AP protein is distributed in the cellular compartment, where it is presumably synthesized, in the membranes of cells and matrix vesicles and, finally, in the extracellular matrix. The present investigation extends the concept of the existence of two states of AP, i.e. anchored and cleaved/extracellular, in mineralized dental tissues, as suggested by previous distinct studies on dentin, cementum, bone, and cartilage (Kurahashi and Yoshiki 1972; Deporter and Ten Cate 1976; Linde and Granström 1980; Orams and Snibson 1982; Gomez and Boyde 1994; Groeneveld et al. 1995; Linde and Lundgren 1995; Takano 1995; Wöltgens et al. 1995). More specifically, (a) during dentin biomineralization, the junction between predentin and dentin was particularly rich in TNAP protein, which would be enzymatically active as shown by histoenzymology (Larsson 1973), and (b) during the maturation stage of enamel formation, the outermost layer of enamel contained TNAP, which would be enzymatically active as shown by histoenzymology (Gomez and Boyde 1994). The tissues studied in this experiment (except mantle dentin) do not mineralize via matrix vesicles, presumably like bone and in contrast to cartilage, in which the role of AP in biomineralization has been extensively investigated (see review by Anderson and Morris 1993). The spatial organization and growth of crystals in these dental systems have been proposed to be under the control of matrix macromolecules, mainly collagen Type I and noncollagenous proteins such as bone sialoprotein, phosphoproteins in dentin (for review see Butler and Ritchie 1995), and very unique enamel proteins, including amelogenins (for review see Zeichner-David et al. 1995), amelin/ameloblastin/sheathlin (Cerny et al. 1996; Krebsbach et al. 1996; Nanci et al. 1998), and enamelin (Hu et al. 1997), which are variably phosphorylated. The present investigation showed that AP is distributed in the extracellular compartment of both enamel and dentin. Functional investigations of AP have been recently highlighted by the phenotype of TNAP null mutants, which is particularly striking in teeth. This enzyme appears to be a protein phosphatase during osteoblast differentiation, locally increasing the available levels of Pi and binding ionic calcium for crystal formation

during biomineralization (for review see Whyte 1994). The extracellular sites of AP protein/activity were located at the predentin/dentin border, specifically at the site of secretion of dentin phosphoproteins (Rabie and Veis 1995). These molecules are called phosphophoryns, because they provide Pi and covalently bind phosphates to crystals that nucleate heterogeneously and grow at the mineralization front. In this specific area, our data support the hypothesis that AP could be bound to collagen Type I, as shown previously (Wu et al. 1991), and could dephosphorylate phosphophoryns, making Pi available for hydroxyapatite crystals, as previously suggested.

A striking feature of the comparison among bone, enamel, and dentin is that proteins important for the formation of mineralized tissues, e.g., TNAP, are expressed not only in the "main" cells, which secrete matrix proteins, osteoblasts, ameloblasts, and odontoblasts (for review, see Kurahashi and Yoshiki 1972; Deporter and Ten Cate 1976; Linde and Granström 1980; Orams and Snibson 1982; De Bernard et al. 1986; Takano et al. 1986; Bonucci et al. 1992; Gomez and Boyde 1994; Linde and Lundgren 1995; Wöltgens et al. 1995; and this study), but also and very intensely in "satellite" cells, adjacent to the main cells: osteoprogenitor, supra-ameloblastic, and subodontoblastic cells. The dental specificities of TNAP vs bone were (a) marked overexpression during completion of biomineralization and (b) the organized extracellular gradient of TNAP distribution compared with the diffuse appearance observed in bone matrix. These properties may be key elements in the differential sensitivity of bone and teeth to phosphatase disturbances, as illustrated by experimental hypophosphatasia (Whyte et al. 1995).

#### Acknowledgments

Supported by EA 2380 funds, PHRC AOM 96067, and Laboratories Novartis, Santé Familiale.

#### Literature Cited

- Anagnostou F, Plas C, Forest N (1996) Ecto-alkaline phosphatase considered as levamisole-sensitive phosphohydrolase at physiological pH range during mineralization in cultured fetal calvaria cells. *J Cell Biochem* 60: 484-494
- Anderson HC, Morris DC (1993) Mineralization. In Mundis GR, Martin TJ, eds. *Handbook of Experimental Pharmacology*. Vol 17. Heidelberg, Springer, 267-288
- Aubin JE, Turksen K, Heersche JNM (1993) Osteoblastic cell lineage. In Noda M, ed. *Cellular and Molecular Biology of Bone*. New York, Academic Press, 1-45
- Bègue-Kirn C, Ruch JV, Ridall AL, Butler WT (1998) Comparative analysis of mouse DSP and DPP expression in odontoblasts, preameloblasts and experimentally induced odontoblast-like cells. *Eur J Oral Sci* 106:254-259
- Berdal A (1997) Vitamin-D action on tooth development and biomineralization. In Feldman D, Glorieux FH, Pike JW, eds. *Vitamin D*. New York, Academic Press, 423-435

- Berdal A, Gorter de Vries I, Hotton D, Cuisinier-Gleizes P, Mathieu H (1991) The cellular and extracellular distribution of osteocalcin and dentin phosphoprotein in teeth of vitamin-D deficient rat. *J Biol Buccale* 19:45-53
- Berdal A, Hotton D, Pike JW, Mathieu H, Dupret JM (1993) Cell- and stage-specific expression of vitamin D receptor and calbindin genes in rat incisor: Regulation by 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>. *Dev Biol* 155:172-179
- Berdal A, Hotton D, Saffar JL, Thomasset M, Nanci A (1996) Calbindin-D 9K and calbindin-D 28K in rat mineralized tissues in vivo. *J Bone Miner Res* 11:768-779
- Bonucci E, Silvestrini G, Bianco P (1992) Extracellular alkaline phosphatase activity in mineralizing matrices of cartilage and bone: ultrastructural localization using a cerium-based method. *Histochemistry* 4:323-327
- Borke JL, Zaki EM, Eisenmann DR, Mednieks MI (1995) Localization of plasma membrane Ca<sup>2+</sup> pump mRNA and protein in human ameloblasts by in situ hybridization and immunocytochemistry. *Connect Tissue Res* 33:139-144
- Butler WT, Ritchie H (1995) The nature and functional significance of dentin extracellular matrix proteins. *Int J Dev Biol* 39:169-179
- Cerny R, Slaby I, Hammarström L, Wurtz T (1996) A novel gene expressed in rat ameloblasts codes for proteins with cell binding domains. *J Bone Miner Res* 11:883-891
- Collin P, Nefussi JR, Wetterwald A, Nicolas V, Boy-Lefevre ML, Fleisch H, Forest N (1992) Expression of collagen, osteocalcin and bone alkaline phosphatase in a mineralizing rat osteoblastic cell culture. *Calcif Tissue Int* 50:175-183
- Davideau JL, Celio M, Hotton D, Berdal A (1993) Developmental pattern and subcellular localization of parvalbumin in the rat tooth germ. *Arch Oral Biol* 38:707-715
- Davideau JL, Papagerakis P, Hotton D, Lezot F, Berdal A (1996) In situ hybridization of vitamin D receptor, alkaline phosphatase and osteocalcin gene expression in oro-facial mineralized tissues. *Endocrinology* 137:3577-3585
- Davideau JL, Sahlborg D, Blin C, Papagerakis P, Thesleff I, Berdal A (1995) Differential expression of the full-length and secreted truncated forms of EGF receptor during formation of dental tissues. *Int J Dev Biol* 39:605-615
- de Bernard B, Bianco P, Bonucci E, Costantini M, Lunazzi GC, Martinuzzi P, Modricky C, Moro L, Panfili E, Pollesello P, Stagni N, Vittur F (1986) Biochemical and immunohistochemical evidence that in cartilage an alkaline phosphatase is a Ca<sup>2+</sup>-binding glycoprotein. *J Cell Biol* 103:1615-1623
- Deporter DA, Ten Cate (1976) Fine structural localization of alkaline phosphatase in relation to enamel formation in the mouse molar. *Arch Oral Biol* 21:7-12
- Fong CD, Cerny R, Hammarström L, Slaby I (1998) Sequential expression of an amelogenin gene in mesenchymal and epithelial cells during odontogenesis in rats. *Eur J Oral Sci* 106:324-330
- Gomez S, Boyde A (1994) Correlated alkaline phosphatase histochemistry and quantitative backscattered electron imaging in the study of rat incisor ameloblasts and enamel mineralization. *Microsc Res Tech* 29:29-36
- Goseki M, Oida S, Takeda K, Ogata Y, Iimura T, Maruoka Y, Sasaki S (1995) Identification of bone-type alkaline phosphatase mRNA from human periodontal ligament cells. *J Dent Res* 1:319-322
- Goseki-Sone M, Iimura T, Takeda K, Nifuji A, Ogata Y, Yanagishita M, Oida S (1999) Expression of mRNA encoding tissue-nonspecific alkaline phosphatase in human dental tissues. *Calcif Tissue Int* 64:160-162
- Groeneveld MC, Everts V, Beersten W (1995) Alkaline phosphatase activity in the periodontal ligament and gingiva of the rat molar. *J Dent Res* 7:1374-1381
- Hoshi K, Amizuka N, Oda K, Ikehara Y, Ozawa K (1997) Immunolocalization of tissue non-specific alkaline phosphatase in mice. *Histochem Cell Biol* 107:183-191
- Hotton D, Davideau JL, Bernaudin JF, Berdal A (1995) In situ hybridization of calbindin-D 28K transcripts in undecalcified sections of the rat continuously erupting incisor. *Connect Tissue Res* 32:137-143
- Hsu HHT, Morris DC, Davis L, Moylan P, Anderson HC (1993) In vitro Ca deposition by rat matrix vesicles: is the membrane association of alkaline phosphatase essential for matrix vesicle-mediated calcium deposition? *Int J Biochem* 25:1737-1742
- Hu CC, Fukae M, Uchida T, Qian Q, Zhang CH, Ryu OH, Tanabe T, Yamakoshi Y, Murakami C, Dohi N, Shimizu N, Simmer JP (1997) Cloning and characterization of porcine enamel mRNA. *J Dent Res* 76:1720-1729
- Krebsbach PH, Lee SK, Matsuki Y, Kozac CA, Yamada KM, Yamada Y (1996) Full-length sequence, localization and chromosomal mapping of ameloblastin. A novel tooth-specific gene. *J Biol Chem* 271:4431-4435
- Kurahashi Y, Yoshiki S (1972) Electron microscopic localization of alkaline phosphatase in the enamel organ of the young rat. *Arch Oral Biol* 17:155-163
- Larsson A (1973) Ultrastructural observations on early dentine formation with special reference to dentinal globules and alkaline phosphatase activity. *Z Anat Entwicklungsge* 142:103-115
- Linde A, Goldberg M (1993) Dentinogenesis. *Crit Rev Oral Biol Med* 4:679-728
- Linde A, Granström G (1980) Odontoblast alkaline phosphatase and Ca<sup>2+</sup> transport. *J Biol Buccale* 6:293-308
- Linde A, Lundgren T (1995) From serum to the mineral phase. The role of the odontoblast in calcium transport and mineral formation. *Int J Biol* 39:213-222
- Lowry OH, Rosebrough WJ, Farr AL, Randall RJ (1951) Protein measurement with the Folin-phenol reagent. *J Biol Chem* 193:265-275
- Manes T, Glade K, Ziomek CA, Millan JL (1990) Genomic structure and comparison of mouse tissue non-specific alkaline phosphatase genes. *Genomics* 8:541-554
- Nanci A, Smith CE (1992) Development and calcification of enamel. In Bonucci E, ed. *Calcification in Biological Systems*. Boca Raton, FL, CRC Press, 313-343
- Nanci A, Zalzal S, Lavoie P, Kunikata M, Chen W, Krebsbach PH, Yamada Y, Hammarström L, Simmer JP, Fincham AG, Snead ML, Smith CE (1998) Comparative immunohistochemical analyses of the developmental expression and distribution of ameloblastin and amelogenin in rat incisors. *J Histochem Cytochem* 8:911-934
- Noda M, Yoon K, Thiede M, Buenaga R, Weiss M, Henthorn P, Harris H (1987) cDNA cloning of alkaline phosphatase from rat osteosarcoma (ROS 17/2.8) cells. *J Bone Miner Res* 2:161-164
- Orams HJ, Snibson KJ (1982) Ultrastructural localization and gradient of activity of alkaline phosphatase during rodent odontogenesis. *Calcif Tissue Int* 34:273-379
- Pinero GJ, Farach-Carson MC, Devoll RE, Aubin JE, Brunn JC, Butler WT (1995) Bone matrix proteins in osteogenesis and remodelling in the neonatal rat mandible as studied by immunolocalization of osteopontin, bone sialoprotein, alpha 2HS-glycoprotein and alkaline phosphatase. *Arch Oral Biol* 2:145-155
- Rabie AM, Veis A (1995) An immunocytochemical study of the routes of secretion of collagen and phosphophoryn from odontoblasts into dentin. *Connect Tissue Res* 31:197-209
- Ritchie HH, Ritchie DG, Wang LH (1998) Six decades of dentinogenesis research. Historical and prospective views on phosphoryn and dentin sialoprotein. *Eur J Oral Sci* 106:211-220
- Robinson C, Kirkham J, Brookes SJ, Bonass WA, Shore C (1995) The chemistry of enamel development. *Int J Dev Biol* 39:145-152
- Rodan GA, Noda M (1991) Gene expression in osteoblastic cells. *Crit Rev Eukaryotic Gene Express* 1:85-98
- Smith CE, Nanci A (1995) Overview of morphological changes in enamel organ cells associated with major events in amelogenesis. *Int J Dev Biol* 39:153-161
- Stein GS, Van Wijnen AJ, Stein JL, Lian JB (1998) Nuclear structure-skeletal gene expression interrelationships. *Front Biosci* 3:848-864
- Takano Y (1995) Enamel mineralization and the role of ameloblasts in calcium transport. *Connect Tissue Res* 33:127-137
- Takano Y, Ozawa H, Crenshaw MA (1986) Ca ATPase and ALPase activities at the initial calcification sites of dentin and enamel in the rat incisor. *Cell Tissue Res* 243:91-99

- Terao M, Mintz B (1987) Cloning and characterization of a cDNA coding for mouse placental alkaline phosphatase. *Proc Natl Acad Sci USA* 85:319–323
- Thiede MA, Yoon K, Golub EE, Noda M, Rodan GA (1988) Structure and expression of rat osteosarcoma (ROS 17/2.8) alkaline phosphatase: product of a single copy gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 85:319–323
- Van Hoof VO, De Broe ME (1994) Interpretation and clinical significance of alkaline phosphatase isoenzyme pattern. *Crit Rev Clin Lab Sci* 31:197–293
- Waymire KG, Mahuren JD, Jaje M, Guilarte TR, Coburn SP, MacGregor GR (1995) Mice lacking tissue non-specific alkaline phosphatase die from seizures due to defective metabolism of vitamin B-6. *Nature Genet* 11:45–52
- Weinreb M, Shinar D, Rodan G.A (1990) Different pattern of alkaline phosphatase, osteopontin and osteocalcin expression in developing rat bone visualized by in situ hybridization. *J Bone Miner Res* 5:831–842
- Whyte MP (1994) Hypophosphatasia and the role of alkaline phosphatase in skeletal mineralization. *Endocrinol Rev* 4:439–461
- Whyte MP, Landt M, Ryan ML, Mulivor RA, Henthorn PS, Fedde KN, Mahuren JD, Coburn SP (1995) Alkaline phosphatase: placental and tissue-non-specific isoenzymes hydrolyze phosphoethanolamine, inorganic pyrophosphate, and pyridoxal 5'-phosphate. *J Clin Invest* 95:1440–1445
- Wöltgens HM, Lyaruu DM, Bronckers ALJJ, Bervoets TJM, Van Duin M (1995) Biomineralization during early stages of the developing tooth in vitro with special reference to secretory stage of amelogenesis. *Int J Dev Biol* 39:203–212
- Wu LNY, Gense BR, Lloyd GC, Wuthier RE (1991) Collagen-binding proteins in collagenase-released matrix vesicles from cartilage. Interaction between matrix vesicle proteins and different types of collagen. *J Biol Chem* 266:1195–1203
- Yuan ZA, Golub EE, Collier PM, Gibson CW (1995) Bovine enamel organ express tissue non-specific alkaline phosphatase mRNA. *J Dent Res* 74:1886–1890
- Zeichner-David M, Diekwish T, Fincham A, Lau E, MacDougall M, Moradian-Oldak J, Simmer J, Snead M, Slavkin HC (1995) Control of ameloblast differentiation. *Int J Dev Biol* 39:69–92

### V.A.3. ARTICLE 3

PAPAGERAKIS P., MacDOUGALL M., **HOTTON D.**, BAILLEUL-FORESTIER I., OBOEUF M., BERDAL A., FOREST N., BERDAL A. *Expression of amelogenin in odontoblasts. Bone, 2003.*

L'amélogénine est la protéine majoritaire de l'émail produite par des améloblastes. Son expression a été montrée régulée respectivement dans les améloblastes de rats déficients en vitamine D.

Le rôle clé de l'amélogénine dans ce processus a été clairement démontré suite à la publication du phénotype de la souris mutante nulle (Gibson et coll., 2001). L'émail de cette souris est hypoplasique et l'organisation des prismes d'émail altérée. Ceci démontre l'importance de l'amélogénine dans ce processus. Une similitude avait été établie entre les défauts de l'émail initiés par l'inactivation du gène de l'amélogénine et ceux induits par le rachitisme en corrélation avec la vitamine D-dépendante de l'amélogénine (Papagérakis et coll., 1999). Plusieurs auteurs avaient mis en évidence un rôle de molécule signal de la protéine durant la formation des tissus minéralisés (Nanci et coll., 1998 ; Zeichner-David et coll., 1977 ; Papagérakis et coll., 1999).

Plusieurs autres auteurs (Inai et coll., 1991 ; Sawada et coll., 1995) considéraient qu'une diffusion ou une translocation de la protéine était à l'origine de sa présence dans l'épithélium de la racine et dans la dentine. Des résultats plus récents encore montraient par RT-PCR, la présence des transcrits de l'amélogénine dans une banque d'ADN d'odontoblastes de pulpe de rat (Veis et coll., 2000) et dans les odontoblastes de porc (Oida et coll., 2002).

Basé sur l'émergence réciproque des schémas d'expression d'autres protéines dentaires dans les cellules épithéliales et mésenchymateuses et les résultats récents en RT-PCR, le but de ce travail a été de rechercher le schéma d'expression de l'amélogénine (ARN et protéine) pendant le développement des odontoblastes avec différentes approches méthodologiques :

- In vitro, culture de cellules d'ectomésenchyme dentaire et RT-PCR ;
- In vivo, hybridation *in situ*, northern-blotting et immunohistochimie en microscopie électronique.

Nos résultats *in situ* montrent avec les mêmes approches technologiques utilisées pour la Calbindine D28k que l'amélogénine (ARNm et protéine) est exprimée par les odontoblastes jeunes au niveau de la dentine manteau et serait donc un composant de la matrice dentinaire. De plus, une régulation hormonale spécifique inverse (par la vitamine D) est mise en évidence dans les odontoblastes par rapport aux améloblastes.

Cette publication supporte donc avec des données publiées à partir des années 2000 (papier fondateur, Veis et coll., 2000) que l'expression des protéines de l'émail ne se cantonne pas à l'émail.

## Expression of amelogenin in odontoblasts<sup>☆</sup>

P. Papagerakis,<sup>a,b,\*</sup> M. MacDougall,<sup>a</sup> D. Hotton,<sup>b</sup> I. Bailleul-Forestier,<sup>b</sup>  
M. Oboeuf,<sup>b</sup> and A. Berdal<sup>b</sup>

<sup>a</sup> Department of Pediatric Dentistry, Dental School, University of Texas Health Science Center at San Antonio, San Antonio, TX 78284, USA

<sup>b</sup> INSERM, EML-U 0110, UP7, Institut des Cordeliers, Paris, France

Received 10 April 2002; revised 24 September 2002; accepted 21 October 2002

### Abstract

Amelogenin is the major enamel protein produced by ameloblasts. Its expression has been shown to be down-regulated in ameloblasts of vitamin-D-deficient (–D) rats. The potential expression and localization of amelogenin in odontoblasts and its regulation by vitamin D were investigated in this study. RT-PCR and semi-quantitative Northern blot analyses were performed using the odontoblast cell line MO6-G3 and microdissected dental pulp mesenchyme. Both in vitro and in vivo odontoblasts expressed various alternatively spliced amelogenin transcripts. In situ hybridization studies showed that amelogenin expression was restricted to young odontoblasts during mantle dentin deposition. Electron microscopy studies localized the amelogenin protein in the odontoblast cell process cytoplasm and mantle dentin. Amelogenin immunolabeling was stronger in –D rats, suggesting an inverse regulation by vitamin D in odontoblasts. Furthermore, amelogenin mRNA steady-state levels were significantly increased in –D dental pulp mesenchyme. In addition, a temporal–spatial lengthening of the mantle dentin stage was observed in –D animals, suggesting that developmental perturbations occur in relation to the vitamin D status and/or amelogenin expression. These data show that amelogenin is expressed by odontoblasts selectively during mantle dentin deposition. This developmentally regulated expression pattern is enhanced under vitamin-D-deficiency status and in a broader context may play an important role during ameloblast and odontoblast differentiation and function.

© 2003 Elsevier Science (USA). All rights reserved.

**Keywords:** Amelogenin; Odontoblasts; Vitamin D; Enamel; Dentin; Epithelial–mesenchymal interactions

### Introduction

During tooth formation, instructive epithelial–mesenchymal interactions result in the cytodifferentiation of epithelial cells into ameloblasts and ectomesenchymal cells into odontoblasts [1,2]. These differentiated cells produce the enamel extracellular matrix (ECM) and the dentin ECM, respectively [3–7]. Amelogenesis, the process of enamel formation, occurs in three morphologically distinct stages: the presecretory, consisting of ameloblast cytodifferentiation; secretory, with the bulk of enamel matrix formation; and

maturation, associated with matrix mineralization [8,9]. During dentinogenesis, the process of dentin formation, the dental papilla cells located at the epithelial–mesenchymal interface align forming a sheet of cuboidal cells that gradually differentiate into columnar-shape odontoblasts concomitant with ameloblast differentiation [5,10–12]. Odontoblasts initially secrete a fibrous collagenous matrix called mantle dentin [5]. As these cells further differentiate they become highly polarized with specialized odontoblast cell processes that transverse the mineralized circumpulpal dentin, forming dentin tubules [13,14].

Both amelogenesis and dentinogenesis result in the coordinated expression of several extracellular matrix proteins that originally were reported to be tissue-specific but are now recognized as being tooth-specific. Among these proteins amelogenin (Amel) and enamelin have been considered exclusively expressed by the ameloblasts [7,15–17] in contrast to ameloblastin (Ambn), which is also expressed

<sup>☆</sup> Sponsored by NIH/NIDCR Grants R01 DE11658 (MM) and P01 DE11688 (MM).

\* Corresponding author. Department of Pediatric Dentistry, University of Texas Health Science Center at San Antonio 7703 Floyd Curl Drive, MC 7888, San Antonio, TX 78284-7888, USA.

E-mail address: papagerakis@uthscsa.edu (P. Papagerakis).

transiently by the odontoblasts [17–19]. Likewise, the major dentin proteins dentin sialoprotein and dentin phosphoprotein, encoded by the dentin sialophosphoprotein (DSPP) gene [20,21], have been shown to be expressed transiently by the preameloblasts prior to the secretory stage of enamel formation [15,22–26]. Therefore, it has been proposed that some matrix molecules, such as Ambn and DSPP, act as signal molecules in the epithelial–mesenchymal interactions prior to matrix formation as well as in the mineralization process associated with formation of the dentinal enamel junction (DEJ) [15,17,23–26].

Amel, the major enamel ECM protein, is produced by ameloblasts and then secreted in the forming enamel [7,27,28]. Over 10 isoforms have been characterized derived by alternative splicing at the mRNA level [29,30]. These isoforms together with the extensive posttranslation modifications produce the variability of amelogenin proteins within the forming enamel [8]. Amel proteins are cleaved by specific enzymes, being degraded and then removed from the enamel matrix associated with the progression of enamel mineralization and maturation [31,32]. The key role of Amel in this process has recently been demonstrated by the generation of a null mutation in mice [33]. In Amel (–/–) mice the enamel layer was dramatically reduced (hypoplastic) and the characteristic prismatic enamel pattern was completely absent, demonstrating the importance of Amel for proper enamel organization [33]. Interestingly, similar enamel defects were observed in rickets in correlation with the down-regulation of Amel mRNA in ameloblasts, implicating altered Amel expression with the dental rachitic phenotype [34].

Recently, several authors have proposed and showed evidence that amelogenin also acts as a signal molecule during mineralized tissue formation [17,30,34–36]. For example, a mixture of porcine enamel proteins has been shown to induce cementogenesis along the tooth root surface, with the activity component identified as amelogenin [35]. In addition, Amel peptides are suggested to interact with immature mesenchymal cells and initiate a phenotypic and maturation pathway toward a chondrogenic/osteogenic lineage [36]. Amel immunoreactivity has been detected in both root epithelium [37,38] and dentin [17,39–41]. A scenario proposed by several authors [40–42] is that Amel peptides originating from the ameloblast layer diffuse or translocate into the preodontoblast layer and dentin. However, recently Amel mRNA expression has been reported by RT-PCR analysis in a rat pulp/odontoblast cDNA library [36] and in porcine odontoblasts [43], suggesting that odontoblasts also express Amel.

Based on the emerging pattern of reciprocal expression of other tooth proteins in epithelial and mesenchymal cells and recent RT-PCR data, the purpose of the present study was to investigate the developmental expression pattern of Amel by odontoblasts through various *in vitro* and *in vivo* approaches at both the mRNA and the protein level. In addition, since dentin defects were evident in vitamin-D-

deficient animals, the potential regulation of Amel by  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  was investigated in odontoblasts.

## Materials and methods

### Dental cell cultures

Dental papilla mesenchymal cells have been isolated from Swiss Webster E-18 first mandibular molars and placed in monolayer culture, as previously described [44,45]. From these primary cultures several immortalized cell lines have been established and characterized. These cell lines have been extensively characterized by RT-PCR, Northern blot analysis, and immunocytochemistry for the expression of various dentin matrix proteins as well as key transcription factors, cytokines, and growth factors that play key roles during dentinogenesis. Based on these findings, the cell lines have been shown to be stable, maintaining expression patterns similar to those observed *in vivo* after long-term culture and staged as to their point of cytodifferentiation within the odontoblast lineage [45]. Three cell lines representative of dental pulp cells (negative for DSPP), odontoblasts (positive for DSPP), and mature odontoblasts (positive for DSPP with high levels of alkaline phosphatase and mineralized matrix formation) were used for this study.

Cells were plated at low density in  $\alpha$ -MEM supplemented with 10% fetal calf serum, 100 U/ml penicillin/streptomycin, and 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  ascorbic acid and incubated at 33°C in a humidified atmosphere of 95% air and 5%  $\text{CO}_2$  for 10 days until confluence. All culture supplies were purchased from Gibco (Grand Island, NY, USA).

### Isolation of mRNA

Terminal cultures were rinsed with phosphate-buffered saline (PBS) solution, and mRNA was isolated using the Micro-Fast Track mRNA isolation kit according to the manufacturer's protocol (Invitrogen, San Diego, CA, USA). The isolated RNA was resuspended in 10  $\mu\text{l}$  of sterile water and the concentration determined directly by absorbance spectrophotometry at 260 nm.

### Reverse transcription/PCR amplification

An aliquot (1  $\mu\text{g}$ ) of mRNA was converted using reverse transcriptase (MML V-RT) and the resulting cDNA was amplified, using specific Amel primers (exon2F: 5'-AAC-CATCAAGAAATGGGGACC-3' and exon5R: 5'-TAC-CACTTCAAAGGGGTAAGC-3'; GenBank Accession No. D31768). The resulting products were separated by 2% agarose gel electrophoresis and gels were stained with ethidium bromide for 15 min, destained in water, and photographed.



### Animals

For tissue distribution studies, 56-day-old Sprague–Dawley rats ( $n = 20$ ; CERJ, Le Genest-Saint-Isle, France), fed with a standard diet, were studied by *in situ* hybridization and Northern blotting.

For vitamin D studies 3-week-old Sprague–Dawley rats ( $n = 20$ ) were kept for 5 weeks under UV-light-free conditions and given a vitamin-D-deficient diet (–D rats), as previously described [46]. In addition, Sprague–Dawley rats ( $n = 20$ ), fed with a standard diet, were used as controls (+D).

For developmental studies in vitamin-D-deficient rats, Sprague–Dawley rats ( $n = 140$ ) were raised from vitamin-D-deficient mothers, housed in a dark room, and fed *ad libitum* with a vitamin-D-deficient diet (–D second generation animals), as previously described [47]. Animals were randomly sacrificed, in accordance with the international rules of laboratory animals, at 1, 2, 3, 4, 6, and 9 days postnatal for ultrastructural studies. In addition, Sprague–Dawley rats ( $n = 20$ ) raised from normal mothers and fed with a standard diet were used as controls (+D).

### *In situ* hybridization

Amel sense and antisense RNA probes were prepared from full-length cDNA subcloned into Bluescript plasmid [48] and labeled with [ $^{35}$ S]UTP by *in vitro* transcription using T7 and/or T3 RNA polymerase (Boehringer, Meylan, France).

For *in situ* hybridization experiments, animals ( $n = 20$ ) were perfused with 4% paraformaldehyde, 10% sucrose in PBS for 15 min. Mandibles were dissected, fixed by immersion in the same fixative for 1 h at 4°C, and rinsed in 15% sucrose overnight at 4°C. Cryostat sections were prepared and *in situ* hybridization was performed as previously described [49]. Briefly, sections were fixed in a 4% paraformaldehyde solution, washed in  $2\times$  SSC, pretreated with proteinase K (Sigma, la Verpillière, France), acetylated, and hybridized with the labeled probes, diluted to about 60,000cpm/ $\mu$ l, in a humid chamber overnight at 50°C for 16 h. Sections were then washed under high-stringency conditions and treated with RNase A (Sigma). The slides were dipped into LMI emulsion (Amersham, les Ulis, France) and exposed for 10 days at 4°C. After development, sections were stained with hematoxylin (Sigma), dehydrated, and mounted with DePex medium (OSI). Sections were observed and photographed with a Leitz Orthoplan photomicroscope.

### Northern blotting

For Northern blot analysis mandibles were removed and incisors were isolated and microdissected to separate dental epithelium and mesenchyme as previously described [34,46]. Total RNAs were isolated from both the dental

mesenchyme and the epithelium using a guanidium thiocyanate–phenol chloroform procedure (Euromedex, France). Total RNAs (10  $\mu$ g) were electrophoretically fractionated on a 1% agarose–formaldehyde gel and transferred onto a nylon membrane (Amersham). Membranes were prehybridized followed by hybridization with a rat Amel cDNA probe [48]  $P^{32}$  labeled by random priming (Boehringer). All membranes were stripped by washing in 50% formamide and 10 mM phosphate buffer, pH 6.5, for 30 min at 65°C and then rehybridized with glucose glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) cDNA probe as a control. The hybridized blots were autoradiographed using Kodak film (Amersham) and all experiments were repeated three times. The optical density of the bands was quantitated by computer-assisted video densitometry (Genomic, Visio-Mic II). The relative optical densities obtained using the Amel probe were divided by those obtained with the GAPDH probe to normalize for sample variation. The results are expressed as the mean  $\pm$  SE of four separate experiments with significance determined using a *t* test ( $P \leq 0.05$ ).

### Electron microscopy

Animals for electron microscopy ( $n = 140$ ) were perfused with 4% paraformaldehyde plus 2.5% glutaraldehyde in 0.1 M cacodylate buffer, pH 7.3, as previously described [47]. Briefly, mandibles were dissected, fixed by immersion in the same fixative for 90 min at 4°C, rinsed in 0.1 M cacodylate buffer, and postfixed in the same buffer containing 3% osmic acid for 1 h. Molars were dissected out and processed for embedding in epon. Section (80 nm) were cut using a LKB Ultratome III ultramicrotome and mounted onto 300-mesh nickel grids. The sections were stained in

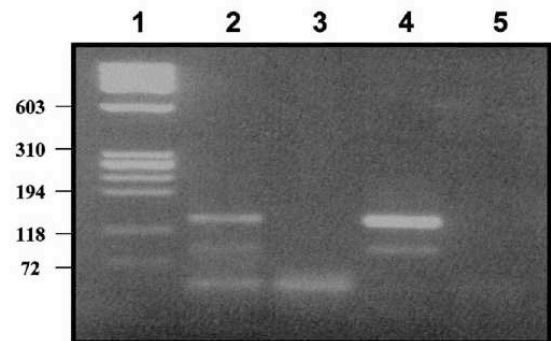


Fig. 1. RT-PCR of Amel mRNA in dental mesenchymal cell lines. PCR amplification reactions were performed with a specific Amel primer set and the resulting products were resolved on a 2% agarose gel. Two major Amel mRNA transcripts (137 and 86 bp) were amplified from the mouse tooth cDNA library (lane 4) and odontoblast cell line MO6-G3 (lane 2). By contrast, the dental pulp and mature odontoblast cell lines were negative (lanes 3 and 5, respectively). Lane 1 is the DNA molecular weight marker with fragment sizes indicated on the left.

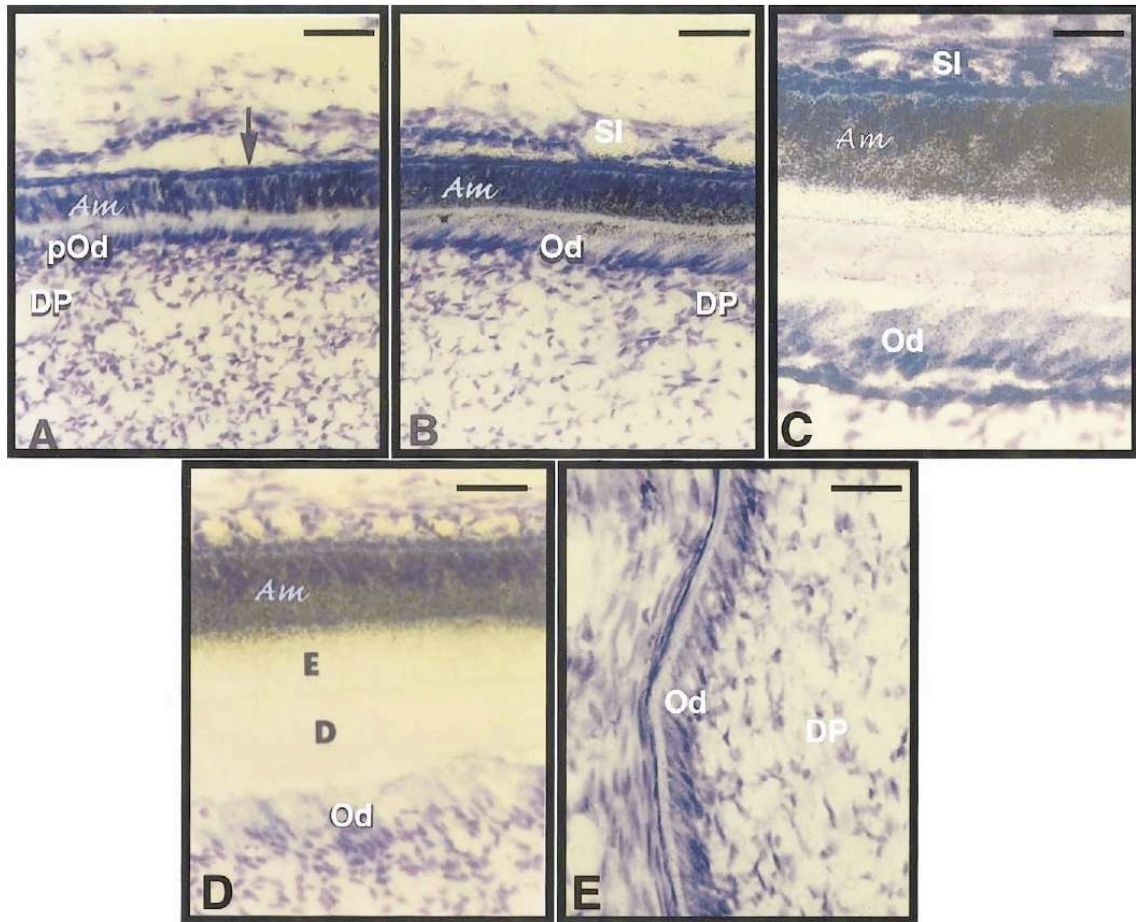


Fig. 2. In situ hybridization detection of Amel mRNA during tooth development. (A) Amel mRNA was detected in ameloblasts (black arrow) while preodontoblasts were negative (original magnification, 400 $\times$ ). (B) During the secretion stage, Amel was detected in both ameloblasts and young odontoblasts associated with mantle dentin formation. Subpopulations of stratum intermedium cells were also positive for Amel transcripts (original magnification, 400 $\times$ ). (C) Staining in odontoblasts decreased shortly after mantle dentin deposition (Original magnification, 1260 $\times$ ). Later stages of odontoblast cytodifferentiation such as mature odontoblast association with mineralized dentin (D, original magnification, 800 $\times$ ) as well as root odontoblasts (E, original magnification, 1260 $\times$ ) were negative for Amel. Abbreviations: Am, ameloblasts; DP, dental pulp; pOd, preodontoblasts; Od, odontoblasts; E, enamel; and D, dentin.

aqueous uranyl acetate and lead citrate and observed with a Philips CM12 (80 kV) transmission electron microscope.

#### Immunogold localization of Amel

Tissue sections were first incubated at room temperature with 0.01 M PBS at pH 7.3 containing 1% ovalbumin (oval; Sigma) for 5 min, followed by antiserum for 1 h. Immunolocalizations on serial sections were performed using antibodies directed against rat amelogenin (generous gift of Pr. S. Sasaki, Dental School, Tokyo, Japan), diluted at 1:1000. Normal rabbit serum (Sigma) diluted 1:200 was used for negative control replacing the primary antibody. Following incubation the sections were washed with PBS, floated for 5

min on PBS-oval, and reacted for 30 min with protein A complexed to colloidal gold particles. The sections were then washed with PBS followed by distilled water, stained with aqueous uranyl acetate and lead citrate, and examined with a Philips CM12 (80 kV) transmission electron microscope.

#### Results

The expression of Amel by odontoblasts was initially investigated using three mouse immortalized cell lines representative of the odontoblasts lineage: dental pulp, odontoblasts, and mature odontoblast. Amel transcripts were

detected by RT-PCR only in the cell line MO6-G3, representative of an odontoblast [45]. The PCR products were directly subcloned and sequenced to confirm the presence of Amel transcripts. By using specific Amel primers to exons 2 (forward) and 5 (reverse) two alternative splice transcripts were detected in the MO6-G3 sample (Fig. 1, lane 4), similar to that detected in the cDNA tooth library sample (Fig. 1, lane 2) and previously reported in ameloblasts. DNA sequence analysis showed that the largest transcript (137 bp) contained exon 2 (66 bp), exon 3 (48 bp), and part of exon 5 (23 bp). In the smaller product (89 bp) exon 3 was not present. Interestingly, exon 4 was not present in any of the sequenced PCR products. However, some RT-PCR experiments resulted in a very faint product of the size expected (179 bp; not shown) of the full-length Amel transcript (exons 2, 3, 4, and part of 5). Dental pulp cells (Fig. 1, lane 3) and mature odontoblasts (Fig. 1, lane 5) were negative for Amel transcripts. RT-PCR reaction without conversion of the mRNA to cDNA was performed as a negative control (not shown) and resulted in no amplification.

The Amel mRNA expression pattern was confirmed in vivo using in situ hybridization (Fig. 2A–E). Amel mRNA was detected in the ameloblast but also in the odontoblast cell layer of the rat incisor during tooth development. The preodontoblasts and dental pulp cells were negative for Amel expression (Fig. 2A). However, Amel transcripts were detectable, beginning in the young odontoblasts, concomitant with the deposition of mantle dentin (Fig. 2B). Amel mRNA transcripts were mainly localized toward the distal pole of the polarizing odontoblasts. In addition, Amel transcripts were also detected in the epithelial stratum intermedium at this same stage (Fig. 2B). Once the formation of mantle dentin was complete, Amel expression progressively diminished within the maturing odontoblast and stratum intermedium cell layers (Fig. 2C). Finally, the mature odontoblasts associated with the forming mineralized dentin were devoid of detectable transcripts (Fig. 2D). Interestingly, odontoblasts associated with root were also negative for Amel transcripts (Fig. 2E).

In addition, Northern blots revealed Amel transcripts present in both dental enamel organ epithelium (EOE) as previously described [34] and dental pulp mesenchyme (DPM) as shown in Fig. 3A. The potential regulation of Amel by vitamin D was investigated using rat incisor DPM isolated from +D and –D samples used in previous experiments [34]. DPM Amel steady-state levels were compared to those of the housekeeping gene GAPDH (Fig. 3A). This comparative analysis showed striking differences in the steady-state levels of Amel mRNA between control (+D)

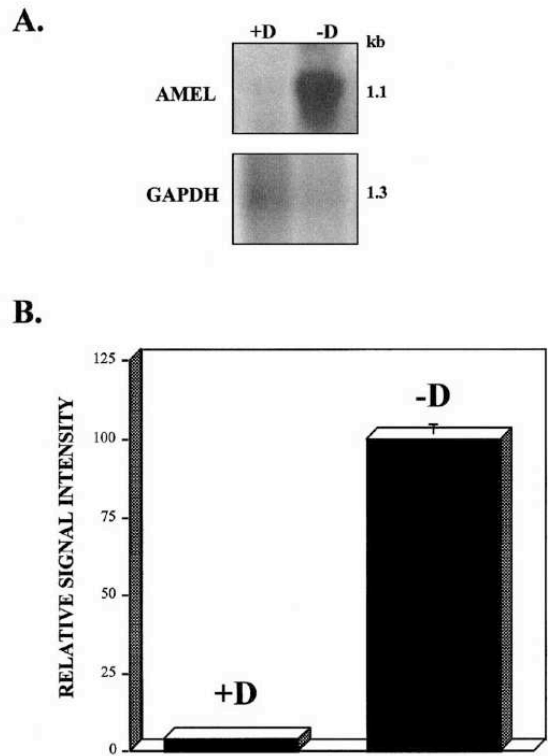
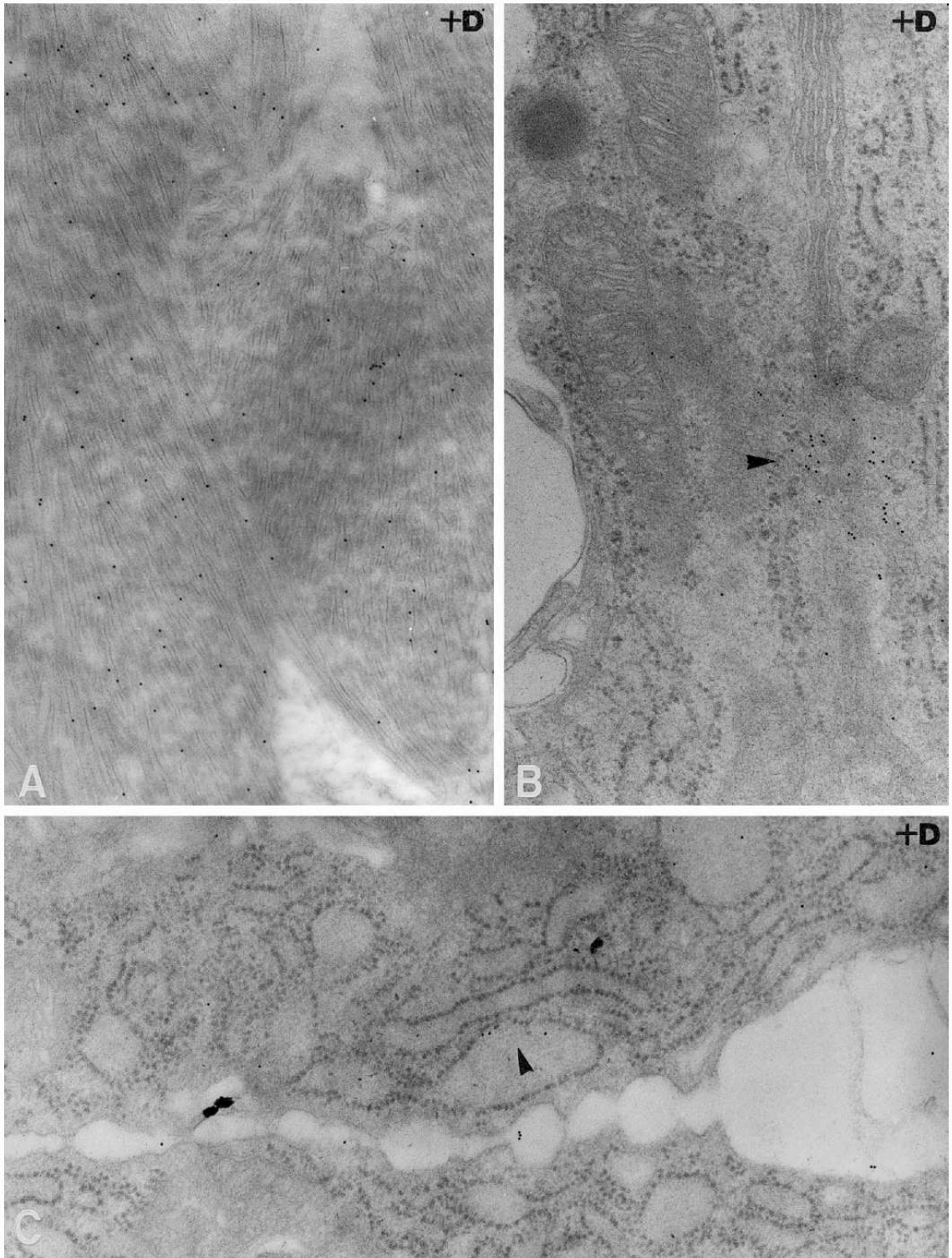


Fig. 3. Odontoblast regulation of the Amel mRNA in vitamin-D-deficient rats. Dental pulp mesenchyme was microdissected from vitamin-D-deficient rats (–D) and control animals (+D), mRNA was isolated, and Northern blot membranes were prepared (A) Membranes were sequentially probed with Amel and GAPDH full-length cDNAs and Amel steady-state mRNA levels compared between –D and +D animals related to the major Amel transcript (1.1 kb). The relative levels of Amel expression were evaluated by comparison with the optical density values obtained with the GAPDH probe. (B) Expression of Amel mRNA was significantly up-regulated ( $P \leq 0.05$ ) in vitamin-D-deficient dental pulp mesenchyme samples.

and vitamin-D-deficient (–D) DPM (Fig. 3B). Amel mRNA expression levels were clearly up-regulated in –D DPM compared to the +D samples ( $P \leq 0.05$ ; Fig. 3A and B).

To investigate the localization and distribution of Amel protein within the odontoblasts and dentin matrix, and to confirm the up-regulation of Amel expression in this cell population associated with vitamin-D-deficiency status, electron microscopy immunocytochemistry was performed in both +D and –D animals. Amel immunoreactivity in the

Fig. 4. Electron microscopy analysis of Amel protein distribution within ameloblast and odontoblast cells of +D rat molars. (A) The extracellular enamel matrix contains a significant amount of immunogold particles (original magnification, 20,000 $\times$ ). (B) Amel immunostaining was detected inside the Golgi apparatus of ameloblast cells (black arrowhead; original magnification, 55,000 $\times$ ). (C) Amel immunostaining was also found at low levels inside the Golgi apparatus of odontoblast in +D rats (black arrowhead; original magnification, 55,000 $\times$ ).



+D animals was found not only in ameloblasts and enamel matrix (Fig. 4A and B) but also at much lower levels within the dentin matrix and odontoblasts (Fig. 4C). In contrast, the –D animals showed a very clear staining within the dentin matrix and odontoblasts (Fig. 5A–E). Amel was present in significant amounts in rachitic dentin distributed in an electron-dense network within mantle dentin (Fig. 5C) in the vicinity of odontoblast cell processes (Fig. 5D) as well as within the cytoplasm of these cell processes (Fig. 5E). The specificity of the Amel immunoreaction was established by performing negative controls with preimmune primary antibody that resulted in no detectable labeling (data not shown).

Finally, the high Amel expression levels in the vitamin-D-deficiency status appeared to be related to a particular stage of dentinogenesis in the –D rachitic rats. In control rats (+D), the progression of dentinogenesis includes a phase of transient mantle dentin deposition and biomineralization followed by the formation of the more abundant circumpulpal dentin containing dentin tubules. This transition from mantle dentin to circumpulpal dentin formation and mineralization corresponds to the initial deposition of enamel matrix by the ameloblasts and is evident at the ultrastructural level. The most striking feature of rachitic rat molars was a significant lengthening of the mantle dentin transition stage: circumpulpal dentin formation started at 2 postnatal days in +D rats in contrast to a minimal deposition observed not until 6 postnatal days in –D rats. At 9 days in –D rat molars, the majority of lateral aspects of cusps were still at the mantle dentin deposition developmental stage while in +D rat molars only a restricted zone at the cervical loop was still at this same stage (Fig. 6A and B). This lengthening of the transitional mantle dentin stage was also associated with numerous apical digitations in the odontoblast cell processes that were in contact with electron-dense patches merging at the DEJ (Fig. 6A and B).

## Discussion

This study provides data at both the mRNA and the protein level that the major enamel matrix protein Amel is expressed by the mesenchymal-derived odontoblasts and is a component of the dentin matrix. Amel expression was observed within a limited developmental period associated with the formation of mantle dentin by young odontoblasts. The present data support and extend previous studies demonstrating that, during epithelial–mesenchymal interactions leading to the terminal cytodifferentiation of odontogenic cells, transient expression of several tooth matrix proteins by the opposing cell type occurs. These tooth matrix proteins include DMP-1, DSPP, and Ambn, and now we have added Amel to this group. Interestingly, a reverse regulation of Amel expression by vitamin D was found in the mesenchymal odontoblasts compared to the epithelial ameloblasts, suggesting tissue-specific mechanisms of hormonal regula-

tion related to tooth matrix formation. Finally, a prolonging of the mantle dentin stage was observed in the –D rats and this was correlated with the pronounced expression of Amel during this discrete stage of dentinogenesis. These data suggest a possible functional correlation between Amel and early matrix deposition by both odontoblasts and ameloblasts at and near the DEJ.

Previous biochemical and immunohistochemical studies have shown that dentin contains small amounts of Amel [39–42,50,51]. This observation was interpreted as a translocation of Amel protein from the preameloblasts to the young odontoblasts [40–42]. However, Amel transcripts were recently identified by RT-PCR from a rat incisor tooth odontoblast–pulp cDNA library [36] and porcine odontoblasts [43], suggesting that cells within the dental pulp mesenchyme could produce this protein.

This study provides the first *in vivo* and *in vitro* data that correlate Amel expression by odontoblasts to a particular stage of their lineage, young odontoblasts associated with mantle dentin formation. Two major Amel transcripts were detectable by RT-PCR expressed by odontoblasts in the cell line MO6-G3. DNA sequence analysis showed no differences between the odontoblast isolated Amel transcripts and those previously described for ameloblasts. Numerous amelogenin transcripts are produced through alternative splicing at the mRNA level [29,34]. The present data suggest that amelogenin alternative splicing is not tissue-specific but also occurs in odontoblasts. An immortalized dental pulp cell line that does not express DSPP, the major odontoblast phenotypic marker, or produce dentin matrix was negative for amelogenin expression. Furthermore, a mature odontoblast cell line was also negative for Amel transcripts. *In vivo in situ* hybridization experiments confirmed Amel expression by young odontoblasts and showed that this expression is limited to the period of mantle dentin deposition. Dental pulp cells, as well as preodontoblasts and mature odontoblasts secreting tubular dentin, were negative in correlation with our *in vitro* findings. Therefore, we conclude that odontoblasts express Amel in a highly restricted development-dependent pattern associated with early mantle dentin formation.

During embryonic tooth development, inductive signals from both the dental epithelium and the mesenchyme determine the number, form, and position of developing teeth [52–54]. Only the cranial neural-crest-derived DPM cells in contact with the inner enamel epithelium basement membrane differentiate into odontoblasts that produce mantle dentin and later tubular dentin [11]. Subsequently, the epithelial cells differentiate in ameloblasts and produce the enamel matrix [7]. It has been reported that preameloblasts transiently express dentin-related DSPP [15,22–26]. Similarly to that, preodontoblasts transiently express the enamel matrix protein Ambn [17–19,22]. In this study, we show that Amel is transiently expressed by odontoblasts during mantle dentin deposition. Thus, Amel expression begins at

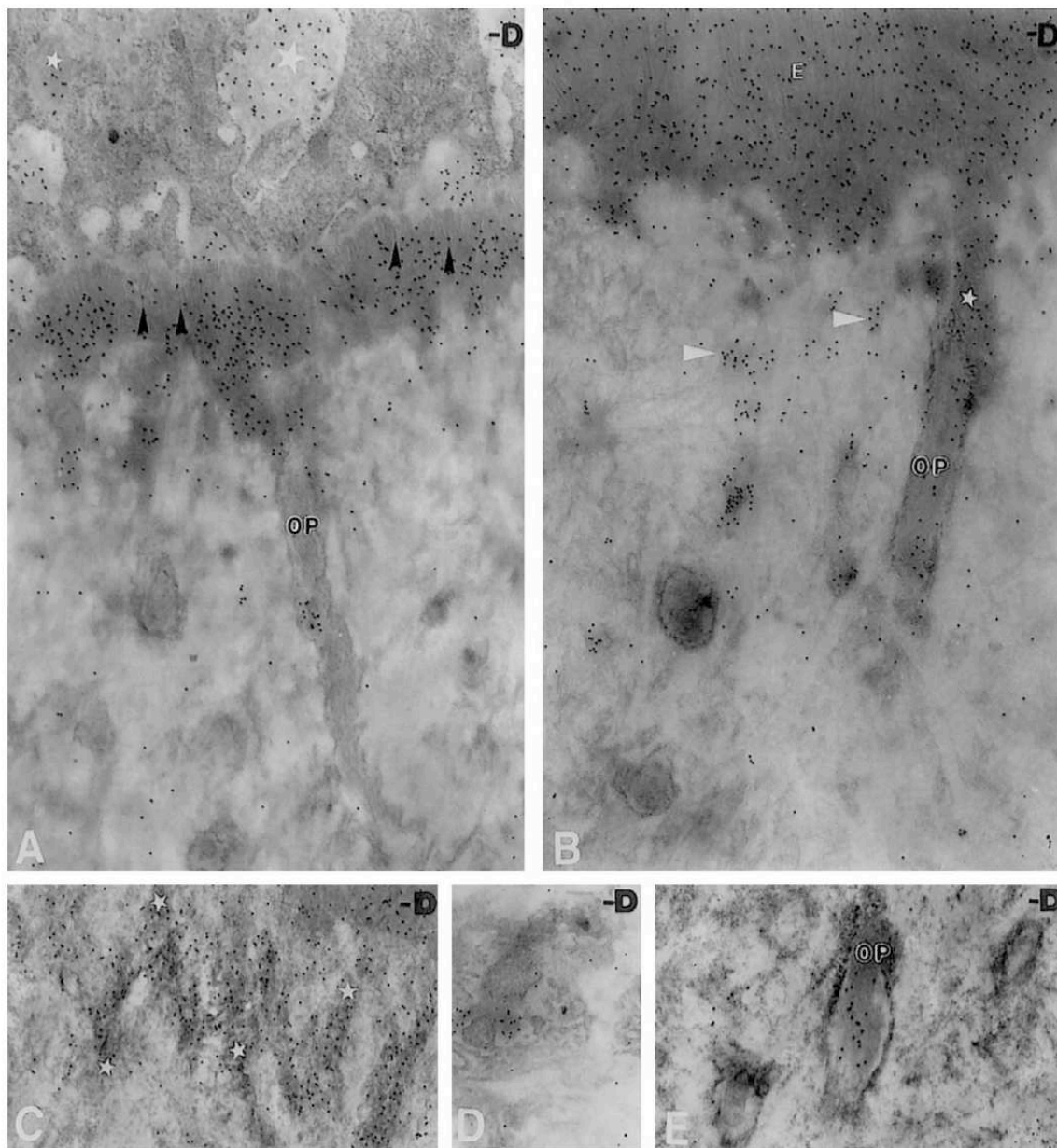
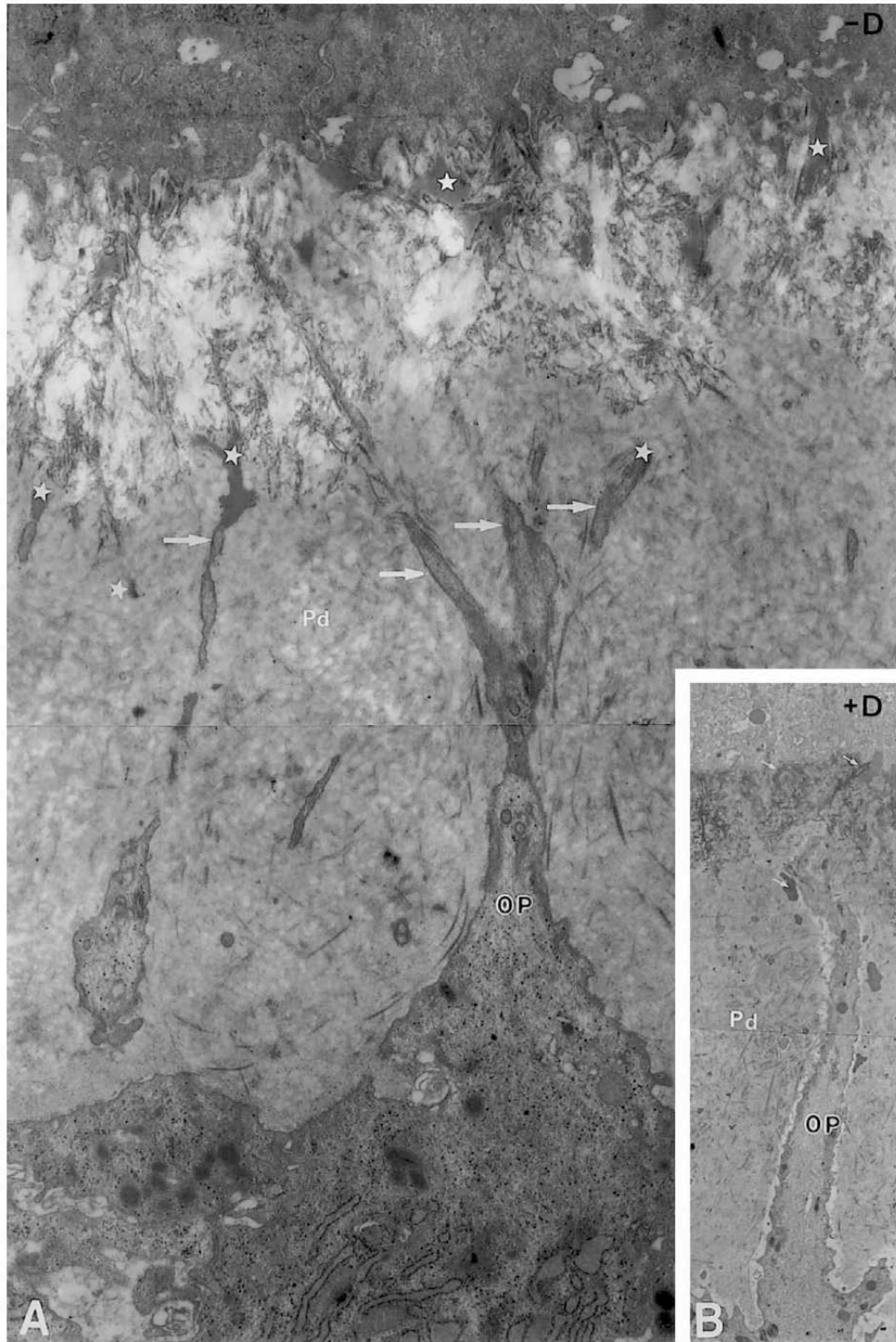


Fig. 5. Electron microscopy analysis of enamel and dentin distribution of Amel in  $-D$  rat molars. (A) Initial inner aprismatic enamel in  $-D$  9-day-old rat molars (original magnification,  $34,000\times$ ). The extracellular enamel matrix, secreted at both the apical (black arrowhead) and the lateral (white star) aspects of the ameloblast, contains significant amounts of immunogold particles. The apical ends of the odontoblast process are associated with the electron-dense Amel-rich enamel patches penetrating inside the dentin. (B) Inner aprismatic enamel in  $-D$  6-day-old rat molars (original magnification,  $34,000\times$ ). The dentin distribution of Amel labeling is associated with the electron-dense patches of enamel (white star), adjoining odontoblast process, and randomly distributed inside mantle dentin (white arrowheads). (C) Higher density of Amel immunolabeling of the enamel network inside mantle dentin (white stars), 6-day-old rat molars (original magnification,  $29,000\times$ ). (D) The relationship between odontoblast process and electron-dense extracellular Amel-rich patches in 6-day-old rat molars (original magnification,  $29,000\times$ ). (E) Six-day-old rat molars showing odontoblast process contains immunoreactive Amel (original magnification,  $29,000\times$ ). Abbreviations: OP, odontoblast process; and E, enamel.



a later stage of odontoblast cytodifferentiation than that previously reported for Ambn. Moreover, Amel expression was also detected in stratum intermedium cells during the same development stage with odontoblast expression. Previous studies have shown that cells within the stratum intermedium were positive for X-gal staining in bovine Amel promoter-lacZ transgenic mice [55]. Further detailed studies are warranted to investigate the expression of Amel by stratum intermedium cells and its function related to this cell layer. In summary, the differential expression of matrix proteins during the early stages of dentin matrix formation may represent a continuation of epithelial–mesenchymal interactions and/or may play a role in the progressive terminal differentiation of both the ameloblasts and the odontoblasts. This highly restricted temporal expression pattern may dictate matrix deposition, mineralization, and maturation.

Interestingly, Amel was transiently expressed by coronal odontoblasts during the mantle dentin deposition stage, but not in root odontoblasts, suggesting a site-specific role of Amel during dentinogenesis. Substantial differences in odontoblasts and dentin structure [56] as well as in gene expression patterns [57] have been reported between the root and coronal odontoblasts. Furthermore, differential repair responses of coronal versus radicular regions of rat molar pulp have been induced by BMP-7, suggesting that biological differences exist between coronal and radicular pulp cells [58]. Similarly to odontoblasts, morphologically indistinguishable osteoblasts express a different repertoire of osteoblast-associated markers, suggesting that cell-specific combinations of gene expression may exist [57,59,60]. Our data support and further extend the concept that differences exist between crown and root odontoblasts. These differences may result at least in part from differential gene expression between odontoblast populations as shown in this study for Amel.

In this study we took advantage of a well-characterized experimental animal model of nutritional rickets [61] to analyze the potential regulation of Amel by vitamin D in odontoblasts and the potential physiopathological impact of this expression related to dentin formation *in vivo*. Vitamin D is a steroid hormone, which may act via a genomic pathway [62], on both the ameloblast and the odontoblast cells *in vivo* [46,63–65]. Consequently, alterations in enamel and dentin formation are associated with rickets, a condition induced by vitamin D depletion, as reported by several groups [61]. Several molecular targets for vitamin D have been detected in odontogenic cells similar to bone [66,67] and kidney [68], i.e., osteocalcin [69,70] and calbin-

dins [46]. Recently, Amel was found to be positively regulated by vitamin D in rat incisors EOE [34], suggesting that Amel is also a vitamin D target gene. Therefore, in this study Amel transcripts were analyzed in microdissected rat incisor DPM tissues. Samples from vitamin-D-depleted (–D) and control (+D) rat DPM showed an opposite vitamin D sensitivity of Amel expression, i.e., Amel is down-regulation in –D EOE [34] while being up-regulation in –D DPM (this study). High levels of nuclear [65] and membrane-associated [71] vitamin D receptors have been detected in both dental pulp and EOE cells. In contrast, low expression of vitamin D receptors has been observed into odontoblasts, suggesting that mechanisms of vitamin D action are tissue-specific in the tooth [65,71]. Together these data suggest the existence of a complex regulatory pathway for Amel expression by vitamin D in odontogenic cells.

Very recently, Amel immunoreactivity was found in odontoblasts of molars and incisors in biglycan (BGN) knockout mice displaying an osteoporosis-like phenotype [72]. The same authors failed to detect Amel protein in odontoblasts of wild-type mice, suggesting that BGN acts as a repressor of Amel expression [72]. BGN and Amel human genes are both located on the X chromosome [27,73]. In addition, BGN expression in tooth has been reported in ameloblasts and young odontoblasts but not associated with mature odontoblasts [72], similar to the Amel expression pattern shown in this study. Amel expression levels in odontoblasts are enhanced (up-regulated) under the pathological situation of nutritional rickets (this study) as well as in biglycan knockout mice [72]. Interestingly, biglycan has been identified as a vitamin D target gene in bone cells [74]. Thus, a potential link between vitamin D action and biglycan/Amel expression may exist in the tooth. In the future it will be of interest to investigate biglycan steady-state levels in odontoblasts of vitamin-D-deficient rats. Therefore, vitamin D may play a role in Amel tissue-specific expression via direct and/or indirect regulatory mechanisms.

A prolongation of the initial steps of dentinogenesis, namely mantle dentin formation, was observed in –D rats. This prolonged stage represents the same developmental stage when Amel up-regulation was observed in –D odontoblasts. In fact, circum-pulpal dentin formation, which follows mantle dentin deposition, was delayed several days later in –D rats compared to the control animals (day 6 versus day 2). Thus, the observed altered Amel expression in rickets was associated with perturbations of the initiation of dentin formation, suggesting a potential role for amelogenin in odontoblast cytodifferentiation and subsequent dentin

Fig. 6. Comparative analysis of dentin formation in the lateral sides of molars between vitamin-D-deficient and +D rats. (A) In 9-day-old –D rats, the initiation of mantle dentin mineralization occurs as late as 9 days after birth and only on the lateral crown aspects. Numerous patches of electron-dense material (white stars) are scattered from the apical end of ameloblasts throughout the mantle dentin and predentin. They are located in the vicinity of odontoblast processes, which present numerous ramifications (white arrow; original magnification, 44,000 $\times$ ). (B) +D newborn rats showing corresponding locations of mantle dentin formation and biomineralization. The electron-dense patches (white arrows) show similar extracellular distribution and relationships with odontoblast cell process (original magnification, 12,600 $\times$ ). Abbreviation: OP, odontoblast processes; Pd, predentin.



matrix formation. More in-depth studies on the role of Amel in dentin matrix formation are necessary.

In conclusion, we have provided new insights into the developmental dynamics of Amel expression during tooth development. Our studies provide clear evidence that Amel is expressed in relatively small amounts and in a temporal-dependent pattern by rodent odontoblasts at both the transcriptional and the translational level. Amel expression is associated with the early mantle dentin deposition and mineralization produced by young odontoblasts. Thus, Amel has been characterized as a useful marker for distinct stages of odontoblast cell lineage. In addition, Amel mRNA was differentially regulated by vitamin D in odontoblasts versus the ameloblasts. Amel mRNA up-regulation in –D animals was observed in correlation with a lengthening of mantle dentin deposition, suggesting that the vitamin D regulation of Amel expression in odontoblasts is important in normal epithelial–mesenchymal interactions leading to the functional differentiation of not only ameloblasts but also odontoblasts.

#### Acknowledgments

We thank Dr. W. Bonass (Division of Oral Biology, Dental Institute, Leeds, UK) for the amelogenin cDNA probe. The technical support of Jennifer Schulze in performing the dental cell line cultures is also acknowledged.

#### References

- [1] Maas R, Bei M. The genetic control of early tooth development. *Crit Rev Oral Biol Med* 1997;8:4–39.
- [2] Thesleff I, Sharpe P. Signalling networks regulating dental development. *Mech Dev* 1997;67:111–23.
- [3] Butler WT. Dentin matrix proteins and dentinogenesis. *Connect Tissue Res* 1995;33:56–65.
- [4] Couble ML, Farges JC, Bleicher F, Perrat-Mabillon B, Boudeulle M, Magloire H. Odontoblast differentiation of human dental pulp cells in explant cultures. *Calcif Tissue Int* 2000;66:129–38.
- [5] Linde A, Goldberg M. Dentinogenesis. *Crit Rev Oral Biol Med* 1993;4:679–728.
- [6] Magloire H, Hartmann DJ, Couble ML, Joffre A, Grimaud JA, Herbage D, Ville G. Cytodifferentiation of human pulp cells in explant culture. In: Bilcourt AB, Ruch JV, editors. *Tooth morphogenesis and differentiation*. Paris: INSERM, 1984. p. 119–26.
- [7] Zeichner-David M, Diekwisch T, Fincham A, Lau E, MacDougall M, Moradian-Oldak J, Simmer J, Snead M, Slavkin HC. Control of ameloblast differentiation. *Int J Dev Biol* 1995;39:69–92.
- [8] Robinson C, Brookes SJ, Shore RC, Kirkham J. The developing enamel matrix: nature and function. *Eur J Oral Sci* 1998;106:282–91.
- [9] Smith CE, Nanci A. Overview of morphological changes in enamel organ cells associated with major events in amelogenesis. *Int J Dev Biol* 1995;39:153–61.
- [10] Romagnoli P, Mancini G, Galeotti F, Franchi E, Pireoni P. The crown odontoblasts of rats molars from primary dentinogenesis to complete eruption. *J Dent Res* 1990;69:1857–62.
- [11] Ruch JV, Lesot H, Begue-Kim C. Odontoblast differentiation. *Int J Dev Biol* 1995;39:51–68.
- [12] Sasaki T, Garant PR. Structure and organization of odontoblasts. *Anat Rec* 1996;245:235–49.
- [13] Stratmann U, Schaarschmidt K, Wiesmann HP, Plate U, Hohling HJ, Szuwart T. The mineralization of mantle dentin and of circum-pulpal dentin in the rat: an ultrastructural and element–analytical study. *Anat Embryol (Berl)* 1997;195:289–93.
- [14] Thomas HF. The lamina litans of human tubules. *J Dent Res* 1984;63:1064–6.
- [15] Bleicher F, Couble ML, Farges JC, Couble P, Magloire H. Sequential expression of matrix protein genes in developing rat teeth. *Matrix Biol* 1999;18:133–43.
- [16] Hu JC, Sun X, Zhang C, Simmer JP. A comparison of amelogenin and amelogenin expression in developing mouse molars. *Eur J Oral Sci* 2001;109:125–32.
- [17] Nanci A, Zalzal S, Lavoie P, Kunikata M, Chen W, Kresbach PH, Yamada Y, Hammarstrom L, Simmer JP, Fincham AG, Snead ML, Smith CE. Comparative immunochemical analyses of the developmental expression and distribution of ameloblastin and amelogenin in rat incisors. *J Histochem Cytochem* 1998;46:911–34.
- [18] Fong CD, Cerny R, Hammarstrom L, Slaby I. Sequential expression of an amelogenin gene in mesenchymal and epithelial cells during odontogenesis in rats. *Eur J Oral Sci* 1998;106:324–30.
- [19] MacDougall M, Simmons D, Gu T-T, Forsman-Semb K, Mardh CK, Mesbah M, Forest N, Kresbach PH, Yamada Y, Berdal A. Cloning, characterization and immunolocalization of human ameloblastin. *Eur J Oral Sci* 2000;108:303–10.
- [20] Feng J, Luan X, Wallace J, Ohshima T, Kulkarni A, D'Souza R, Kozak C, MacDougall M. Genomic organization, chromosomal mapping, and promoter analysis of the mouse dentin sialophosphoprotein (Dspp) gene, which codes for both dentin sialoprotein and dentin phosphoprotein. *J Biol Chem* 1998;273:9457–64.
- [21] MacDougall M, Simmons D, Luan X, Nydegger J, Feng J, Gu T-T. Dentin phosphoprotein and dentin sialoprotein are cleavage products expressed from a single transcript coded by a gene on human chromosome 4. Dentin phosphoprotein DNA sequence determination. *J Biol Chem* 1997;272:835–42.
- [22] Begue-Kim C, Kresbach PH, Bartlett JD, Butler WT. Dentin sialoprotein, dentin phosphoprotein, enamelysin and ameloblastin: tooth-specific molecules that are distinctively expressed during murine dental differentiation. *Eur J Oral Sci* 1998;106:963–70.
- [23] D'Souza RN, Cavender A, Sunavala G, Alvarez J, Ohshima T, Kulkarni AB, MacDougall M. Gene expression patterns of murine dentin matrix protein 1 (Dmp 1) and dentin sialophosphoprotein (DSPP) suggest distinct developmental functions in vivo. *J Bone Miner Res* 1997;12:2040–9.
- [24] MacDougall M, Nydegger J, Gu T-T, Simmons D, Luan X, Cavender A, D'Souza RN. Developmental regulation of dentin sialophosphoprotein during ameloblast differentiation: a potential enamel nucleator. *Connect Tissue Res* 1998;39:25–37.
- [25] Papagerakis P, Berdal A, Mesbah M, Peuchmaur M, Malaval L, Nydegger J, Simmer J, MacDougall M. Investigation of osteocalcin, osteonectin, and dentin sialophosphoprotein in developing human teeth. *Bone* 2002;30:377–85.
- [26] Ritchie H, Bery JE, Somerman MJ, Hanks CT, Bronkers AL, Hotton D, Papagerakis P, Berdal A, Butler WT. Dentin sialoprotein (DSP) transcripts: developmentally-sustained expression in odontoblasts and transient expression in pre-ameloblasts. *Eur J Oral Sci* 1997;105:405–13.
- [27] Sasaki S, Shimokawa H. The amelogenin gene. *Int J Dev Biol* 1995;39:127–33.
- [28] Yuan ZA, Collier PM, Rosenbloom J, Gibson CW. Analysis of amelogenin mRNA during bovine tooth development. *Arch Oral Biol* 1996;41:205–13.
- [29] Simmer JP. Alternative splicing of amelogenins. *Connect Tissue Res* 1995;32:131–6.
- [30] Zeichner-David M, Vo H, Tan H, Diekwisch T, Berman B, Thiemann F, Alcocer MD, Hsu P, Wang T, Eyna J, Caton J, Slavkin HC,

- MacDougall M. Timing of the expression of enamel gene products during mouse tooth development. *Int J Dev Biol* 1997;41:27–38.
- [31] Bartlett JD, Simmer JP. Proteinases in developing dental enamel. *Crit Rev Oral Biol Med* 1999;10:425–41.
- [32] Ryu OH, Fincham AG, Hu CC, Zhang C, Qian Q, Bartlett JD, Simmer JP. Characterization of recombinant pig enamelysin activity and cleavage of recombinant pig and mouse amelogenins. *J Dent Res* 1999;78:743–50.
- [33] Gibson CW, Yuan Z-A, Hall B, Longenecker G, Chen E, Thyagarajan T, Sreenath T, Wright JT, Decker S, Piddington R, Harrison G, Kulkarni AB. Amelogenin deficient mice display an amelogenesis imperfecta phenotype. *J Biol Chem* 2001;276:31871–5.
- [34] Papagerakis P, Hotton D, Lezot F, Brookes S, Bonass W, Robinson C, Forest N, Bernal A. Evidence for regulation of amelogenin gene expression by 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> in vivo. *J Cell Biochem* 1999;76:194–205.
- [35] Hannarstrom L. Enamel matrix, cementum development and regeneration. *J Clin Periodontol* 1997;24:658–68.
- [36] Veis A, Tompkins K, Alvares K, Wei K, Wang L, Wang XS, Brownell AG, Jengh S-M, Healy KE. Specific amelogenin gene splicing products have signaling effects on cells in culture and in implants in vivo. *J Biol Chem* 2000;275:41263–72.
- [37] Fong CD, Hammarstrom L. Expression of amelins and amelogenin in epithelial root sheath remnants of fully formed rat molars. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2000;90:218–23.
- [38] Fukae M, Tanabe T, Yamakoshi Y, Yamada M, Ujiiie Y, Oida S. Immunoblot detection and expression of enamel proteins at the apical portion of the forming root in porcine permanent incisor tooth germs. *J Bone Miner Metab* 2001;19:236–43.
- [39] Bronckers AL, D'Souza RN, Butler WT, Lyaruu DM, van Dijk S, Gay S, Wolgens JH. Dentin sialoprotein: biosynthesis and developmental appearance in rat tooth germs in comparison with amelogenins, osteocalcin and collagen type-I. *Cell Tissue Res* 1993;272:237–47.
- [40] Inai T, Kukita T, Ohsaki Y, Nagata K, Kukita A, Kurisu K. Immunohistochemical demonstration of amelogenin penetration toward the dental pulp in the early stages of ameloblast development in rat molar tooth germs. *Anat Rec* 1991;229:259–70.
- [41] Nakamura M, Bringas Jr P, Nanci A, Zeichner-David M, Ashdown B, Slavkin HC. Translocation of enamel proteins from inner enamel epithelia to odontoblasts during mouse tooth development. *Anat Rec* 1994;238:383–96.
- [42] Sawada T, Nanci A. Spatial distribution of enamel proteins and fibronectin at early stages of rat incisor tooth formation. *Arch Oral Biol* 1995;40:1029–38.
- [43] Oida S, Nagano T, Yamakoshi Y, Ando H, Yamada M, Fukae M. Amelogenin gene expression in porcine odontoblasts. *J Dent Res* 2002;81:103–8.
- [44] MacDougall M, Rezendez R, Reyna J, Zeichner-David M. Expression of dentin extracellular matrix proteins by odontoblastic cell cultures. In: Slavkin H, Price P, editors. *Chemistry and biology of mineralized tissues*. Amsterdam: Elsevier, 1992. p. 117–23.
- [45] MacDougall M, Thiemann F, Ta H, Hsu P, Chen LS, Snead ML. Temperature sensitive simian virus 40 large T antigen immortalization of murine odontoblasts cell cultures: establishment of clonal odontoblast cell line. *Connect Tissue Res* 1995;33:97–103.
- [46] Bernal A, Hotton D, Pike JW, Mathieu H, Dupret JM. Cell- and stage-specific expression of vitamin D receptor and calbindin genes in rat incisor: regulation by 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>. *Dev Biol* 1993;32:172–9.
- [47] Bernal A, Balmain N, Cuisinier-Gleizes P, Mathieu H. Histology and microradiography of early post-natal molar tooth development in vitamin D-deficient rats. *Arch Oral Biol* 1987;32:493–8.
- [48] Bonass WA, Robinson PA, Kirkham J, Shore RC, Robinson C. Molecular cloning and DNA sequence of rat amelogenin and a comparative analysis of mammalian amelogenin protein sequence divergence. *Biochem Biophys Res Commun* 1994;198:755–63.
- [49] Hotton D, Davideau J-L, Bernaudin J-F, Bernal A. In situ hybridization of calbindin-D28k transcripts in undecalcified sections of the rat continuously erupting incisor. *Connect Tissue Res* 1995;33:137–43.
- [50] Casasco A, Calligaro A, Casasco M. Ultrastructural immunolocalization of enamel matrix proteins during early stages of ameloblast differentiation. *Ital Anat Embryol* 1995;100:331–40.
- [51] Inai T, Nagata K, Kukita T, Kurisu K. Demonstration of amelogenin in the enamel-free cusps of rat molar tooth germs: immunofluorescent and immunoelectron microscopic studies. *Anat Rec* 1992;4:588–96.
- [52] Buchaille R, Couble ML, Magloire H, Bleicher F. A subtractive PCR-based cDNA library from human odontoblast cells: identification of novel genes expressed in tooth forming cells. *Matrix Biol* 2000;19:421–30.
- [53] Thesleff I, Aberg T. Molecular regulation of tooth development. *Bone* 1999;25:123–5.
- [54] Tucker AS, Sharpe PT. Molecular genetics of tooth morphogenesis and patterning: the right shape in the right place. *J Dent Res* 1999;78:826–34.
- [55] Adeleke-Stainback P, Chen E, Collier P, Yuan ZA, Piddington R, Rosenbloom J, Gibson CW. Analysis of the regulatory region of the bovine X-chromosomal amelogenin gene. *Connect Tissue Res* 1995;32:115–8.
- [56] Lovschall H, Fejerskov O, Josephsen K. Age-related and site-specific changes in the pulpodentinal morphology of rat molars. *Arch Oral Biol* 2002;47:361–7.
- [57] Heersche JN, Reimers SM, Wraan JL, Wayne MM, Gupta AK. Changes in expression of alpha 1 type 1 collagen and osteocalcin mRNA in osteoblasts and odontoblasts at different stages of maturity as shown by in situ hybridization. *Proc Finn Dent Soc* 1992;88:173–82.
- [58] Six N, Lasfargues J-L, Goldberg M. Differential repair responses in the coronal and radicular areas of the exposed rat molar pulp induced by recombinant human bone morphogenetic protein 7 (osteogenic protein 1). *Arch Oral Biol* 2002;47:177–87.
- [59] Candeliere GA, Liu F, Aubin JE. Individual osteoblasts in the developing calvaria express different gene repertoires. *Bone* 2001;28:351–61.
- [60] Liu F, Malaval L, Aubin JE. The mature osteoblast phenotype is characterized by extensive plasticity. *Exp Cell Res* 1997;232:97–105.
- [61] Bernal A. Vitamin D action on tooth development and biomineralization. In: Feldman D, Glorieux FH, Pike JW, editors. *Vitamin D*. New York: Academic Press, 1997. p. 423–35.
- [62] Haussler MR, Whitfield GK, Haussler CA, Hsieh IC, Thompson PD, Selznick SH, Dominguez CE, Jurutka PW. The nuclear vitamin D receptor: biological and molecular regulatory properties revealed. *J Bone Miner Res* 1998;13:325–49.
- [63] Bailleul-Forestier I, Davideau J-L, Papagerakis P, Noble I, Nessmann C, Peuchmaur M, Bernal A. Immunolocalization of vitamin D receptor and calbindin-D28k in human tooth germ. *Pediatric Res* 1996;39:636–42.
- [64] Bernal A, Papagerakis P, Hotton D, Bailleul-Forestier I, Davideau J-L. Ameloblasts and odontoblasts, target cells for 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>: a review. *Int J Dev Biol* 1995;39:257–62.
- [65] Davideau J-L, Papagerakis P, Hotton D, Lezot F, Bernal A. In situ investigation of vitamin D receptor, alkaline phosphatase, and OC gene expression in oro-facial mineralized tissues. *Endocrinology* 1996;137:3577–85.
- [66] Lian JB, Stein GS, Bortell R, Owen AT. Phenotype suppression: a postulated molecular mechanism for mediating the relationship of proliferation and differentiation by *fos/jun* interactions at AP-1 sites in steroid responsive promoter elements of tissue-specific genes. *J Cell Biochem* 1991;45:9–14.
- [67] Lian JB, Stein GS, Stein JL, van Wijnen AJ. Regulated expression of the bone-specific osteocalcin gene by vitamins and hormones. *Vitam Horm* 1999;55:443–509.

- [68] Gill RK, Christakos S. Identification of sequence elements in mouse calbindin-D 28k gene that confer 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>- and butyrate-inducible responses. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993;90: 2984–8.
- [69] Berdal A, Gorter de Vries I, Hotton D, Cuisinier-Grezes P, Mathieu H. The cellular and extracellular distribution of osteocalcin and dentin phosphoprotein in teeth of vitamin D-deficient rats. *J Biol Buccale* 1991;19:45–53.
- [70] Berdal, A, Papagerakis, P, Hotton, D, Bonass, WA, Robinson, C, Forest, N. Experimental investigations on dental matrix proteins in teeth from rachitic rats. In: Boskey, A, Goldberg M, Robinson C, Editors. *Chemistry and biology of mineralized tissues*. Rosemont, IL, USA: American Academy of Orthopaedic Surgeons; 1998, p. 101–6.
- [71] Mesbah M, Nemere I, Papagerakis P, Nefussi J-R, Orestes-Cardoso S, Nessmann C, Berdal A. Expression of a 1,25(OH)<sub>2</sub> vitamin D<sub>3</sub> membrane-associated, rapid response steroid-binding [1,25D<sub>3</sub>-MARRS] protein during human tooth and bone development and biomineralization. *J Bone Miner Res* 2002;17:1588–96.
- [72] Goldberg M, Septier D, Rapoport O, Young M, Amey L. Biglycan is a repressor of amelogenin expression and enamel formation: an emerging hypothesis. *J Dent Res* 2002;81:520–4.
- [73] Geerkens C, Vetter U, Just W, Fedarko NS, Fisher LW, Young MF, Termine JD, Robey PG, Wöhrle D, Vogel W. The X-chromosomal human biglycan gene BGN is subject to X inactivation but is transcribed like an X-Y homologous gene. *Hum Genet* 1995;96:44–52.
- [74] Velez-Yanguas MC, Kalebic T, Maggi M, Kappel CC, Letterio J, Uskokovic M, Helman LJ. 1 alpha, 25-dihydroxy-16-ene-23-yne-26,27-hexafluorocholecalciferol (Ro24-5531) modulation of insulin-like growth factor-binding protein-3 and induction of differentiation and growth arrest in a human osteosarcoma cell line. *J Clin Endocrinol Metab* 1996;81:93–9.

#### V.A.4. ARTICLE 4

MOLLA M., DESCROIX V., AÏOUB M., SIMON S., CASTANEDA B., **HOTTON D.**, BOLANOS A., SIMON Y., LEZOT F., GOUBIN G., BERDAL A. *Enamel protein regulation and dental and periodontal physiopathology in Msx2 mutant mice. American Journal of Pathology, 2010.*

Les isoformes de l'amélogénine et de l'améloblastine sont connues pour leur rôle de protéines de structure de l'émail et ont été proposées comme molécules signales (Gruenbaum-Cohen et coll., 2009). Les peptides de l'amélogénine induisent la différenciation des cellules osseuses via la voie d'activation RunX2 *in vivo* et *in vitro* (Veis et coll., 2000 ; Warotayanont et coll., 2008). Les souris invalidées pour le gène de l'amélogénine présentent une hyperrésorption régionale par l'activation de la voie Rank/RankL. De plus, le gène de l'amélogénine a été un des premiers à être identifié comme un gène-cible de Msx2 pour laquelle la répression transcriptionnelle a été prouvée. Beaucoup de données sur l'action de Msx2 *in vitro* ont été publiées tandis que les relations entre l'expression de Msx2 et les protéines de l'émail n'avaient pas été étudiées *in vivo*.

L'homéogène Msx2 est un membre de la famille Msh (Muscle segment homeobox). Il intervient pendant la morphogénèse dentaire et cranio-faciale, ainsi que plus tardivement dans l'histogénèse des différents tissus. Le mutant nul de Msx2 présente des altérations du phénotype osseux d'importance variable suivant le site (épaisseur de l'os réduite, diminution du nombre des ostéoblastes, chondrogénèse altérée, développement anormal du calvaria ainsi que des défauts des organes d'origine neurectodermique : dents, cheveux, et glandes mammaires) (Aioub et coll., 2007 ; Satokata et coll., 2000). Au contraire, le modèle de surexpression de Msx2 montre une croissance augmentée du calvaria (Liu et coll., 1995). Les mutations humaines de Msx2 montrent un défaut d'ossification au niveau du crâne (Wilkie et coll., 2000) et une craniosynostose de type Boston par gain de fonction (Winograd et coll., 1997). Tous les types de cellules du complexe dento alvéolaire expriment Msx2 sans exception mais en suivant des gradients selon les sites anatomiques (Aioub et coll., 2007).

Msx2 agit comme un répresseur transcriptionnel dans les cellules dentaires (Zhou et coll., 2000). L'homéoprotéine joue un rôle clé dans la différenciation ostéoblastique via la voie ostéoinductive des BMP (Ryoo et coll., 1997) et est impliquée dans la régulation de diverses activités cellulaires comme la prolifération, la différenciation et l'apoptose. Le phénotype alvéolaire des souris Msx2 *-/-* est spécifique avec une ostéopétrose régionale associée à une diminution spécifique de Rank ligand dans l'os alvéolaire.

Cet article pose la question de l'impact *in vivo* de Msx2 sur la quantité et les fonctions éventuelles des protéines de l'émail. Le but de ce travail est d'analyser l'expression des protéines de l'émail *in vivo* chez les souris mutantes de Msx2. Les trois phénotypes des souris (Msx2<sup>+/+</sup> ; Msx2<sup>+/-</sup> et Msx2<sup>-/-</sup>) sont étudiés *in vivo*. Msx2 et les protéines de l'émail sont analysés dans l'épithélium dentaire durant l'ensemble du processus de l'histogénèse dentaire, l'organe de l'émail durant l'amélogénèse, la gaine de Hertwig et les cellules épithéliales de restes de Malassez.

Les techniques mises en œuvre dans ce travail sont : RT QPCR après microdissection des cellules épithéliales, microscopie électronique à balayage, hybridation *in situ* et immunohistochimie. Il est à noter le changement de modèle animal, du rat à la souris, ce qui n'est pas exactement trivial pour les microdissections.

Les études en immunohistochimie montrent une relation inverse entre niveau d'expression de Msx2 et quantité de protéines de l'émail exprimées dans l'épithélium dentaire coronaire et radulaire. Les

améloblastes des souris Msx2 +/- produisent plus d'amélogénines. L'émail présente un avantage avec des prismes de plus gros diamètre et une épaisseur augmentée. Les cellules épithéliales des souris homozygotes Msx2 -/- surexpriment l'amélogénine et l'améloblastine par rapport aux animaux témoins. Les souris Msx2 homozygotes Msx2-/-présentent une diminution de l'activité de résorption périodentaire et une absence d'éruption de la 3ème molaire en relation avec une diminution significative de RANK ligand spécifique de ce site osseux. Ce phénomène a été qualifié «une ostéopétrose régionale» (Aioub et coll., 2007). Les études histologiques montrent par endroits des zones de fusion entre la racine atteinte d'hypercémentose et l'os alvéolaire à proximité de la racine. Cependant, le ligament alvéolo-dentaire persiste. Ainsi, plutôt qu'un phénomène d'ankylose, il semble que l'hypercémentose soit associée à une proximité avec les îlots épithéliaux exprimant les protéines de la biominéralisation, amélogénine et améloblastine qui sont incluses dans le ciment.

La morphologie des épithéliums dentaires est affectée par l'invalidation de l'homéogène Msx2. La présence anormale de groupes géants de cellules épithéliales (îlots de Malassez) augmente avec le temps et est en rapport avec l'âge de l'animal muté nul et la gravité du phénotype. De plus, ces cellules surexpriment anormalement les protéines de l'émail, amélogénines et améloblastine.

Cette étude montre une hiérarchisation moléculaire entre les effecteurs directs de la biominéralisation que sont les protéines amélaire et leur régulation par une homéoprotéine de la famille Msx. Elle révèle le rôle clé de Msx2, gène répresseur de l'amélogénine *in vivo* et suggère deux fonctions de Msx2 : La régulation de l'amélogénine par Msx2 dans l'amélogenèse pourrait limiter la production d'amélogénine et bloquer la synthèse dans d'autres types cellulaires et à d'autres stades cellulaires que le stade de sécrétion des améloblastes. Pendant la sécrétion de la matrice amélaire, Msx2 contrôlerait l'épaisseur de l'émail et la morphogénèse des prismes. En conclusion, Msx2 régulerait l'architecture de l'émail par contrôle du gène de l'amélogénine.

L'apport supplémentaire de cet article est de montrer, dans un contexte physiopathologique, le double impact potentiel des protéines de l'émail sur le plan structurel, reconnu en tant qu'intervenants dans la morphogénèse de l'émail et en tant que molécules signale. L'invalidation de Msx2 détournerait les cellules épithéliales de leur destinée. Des débris épithéliaux de Malassez (DM) s'accumulent et synthétisent des protéines de la biominéralisation : amélogénine, améloblastine et calbindine-D<sub>28k</sub> (Bolanos et coll., en préparation). La surexpression de ces protéines modifierait le métabolisme du calcium qui joue un rôle dans l'initiation des altérations morphologiques au cours du développement. L'amélogénine produite en excès dans le microenvironnement osseux agirait sur l'expression de Runx2 et de Rank ligand montrée affectée chez les mutants nuls, provoquant un déséquilibre de la balance résorption/apposition. Ceci contribuerait à l'ostéopétrose locale observée dans l'os alvéolaire des souris Msx2-/-.

*Molecular Pathogenesis of Genetic and Inherited Diseases*

## Enamel Protein Regulation and Dental and Periodontal Physiopathology in *Msx2* Mutant Mice

Muriel Molla,<sup>\*†‡§¶</sup> Vianney Descroix,<sup>\*†‡§</sup>  
Muhanad Aïoub,<sup>\*†‡§</sup> Stéphane Simon,<sup>\*†‡§</sup>  
Beatriz Castañeda,<sup>\*†‡§||</sup> Dominique Hotton,<sup>\*†‡§</sup>  
Alba Bolaños,<sup>\*†‡§</sup> Yohann Simon,<sup>\*†‡</sup>  
Frédéric Lezot,<sup>\*†‡§</sup> Gérard Goubin,<sup>\*†‡§</sup>  
and Ariane Berdal<sup>\*†‡§¶</sup>

From the Centre de Recherche des Cordeliers,<sup>\*</sup> University of Pierre and Marie Curie-Paris 6, UMRS 872, Paris, France; University of Paris-Descartes,<sup>†</sup> UMRS 872, Paris, France; INSERM U872,<sup>‡</sup> Paris, France; Laboratory of Molecular Oral Physiopathology,<sup>§</sup> University of Paris-Diderot, UFR of Odontology, Paris, France; Reference Center for Oral and Facial Malformations,<sup>¶</sup> Hospital Hotel-Dieu, AP-HP, Paris, France; and the Department of Basic Sciences,<sup>||</sup> University of Antioquia, Medellín, Colombia

**Signaling pathways that underlie postnatal dental and periodontal physiopathology are less studied than those of early tooth development. Members of the muscle segment homeobox gene (*Msx*) family encode homeoproteins that show functional redundancy during development and are known to be involved in epithelial-mesenchymal interactions that lead to crown morphogenesis and ameloblast cell differentiation. This study analyzed the *MSX2* protein during mouse postnatal growth as well as in the adult. The analysis focused on enamel and periodontal defects and enamel proteins in *Msx2*-null mutant mice. In the epithelial lifecycle, the levels of *MSX2* expression and enamel protein secretion were inversely related. *Msx2*<sup>+/-</sup> mice showed increased amelogenin expression, enamel thickness, and rod size. *Msx2*<sup>-/-</sup> mice displayed compound phenotypic characteristics of enamel defects, related to both enamel-specific gene mutations (amelogenin and enamelin) in isolated amelogenesis imperfecta, and cell-cell junction elements (laminin 5 and cytokeratin 5) in other syndromes. These effects were also related to ameloblast disappearance, which differed between incisors and molars. In *Msx2*<sup>-/-</sup> roots, Malassez cells formed giant islands that overexpressed amelogenin and ameloblastin that grew over months. Aberrant expression of enamel proteins is proposed to underlie the regional osteopetrosis and hyperproduction of cellu-**

**lar cementum. These enamel and periodontal phenotypes of *Msx2* mutants constitute the first case report of structural and signaling defects associated with enamel protein overexpression in a post-natal context. (Am J Pathol 2010, 177:2516–2526; DOI: 10.2353/ajpath.2010.091224)**

*Msx2* is a member of the Muscle segment homeobox gene (*Msx*) family, orthologous to the *Msh* gene of *Drosophila*.<sup>1</sup> The mammalian *Msx1* and *Msx2* genes share highly conserved sequences.<sup>2</sup> Their encoded homeoproteins show functional redundancy during development.<sup>2,3</sup> They act as transcriptional repressors which bind specific DNA sequences.<sup>4</sup> In several early developmental processes, *MSX2* signaling pathways have been elucidated. These ones include: cranial suture closing, epithelial-mesenchymal interactions leading to crown morphogenesis,<sup>5</sup> and ameloblast cell differentiation.<sup>6,7</sup> A gain-of-function mutation in the *Msx2* homeobox-gene sequence induces premature suture fusion (Boston-type 2 craniosynostosis; OMIM 604757).<sup>8</sup> Conversely, a mutation leading to reduced *MSX2* DNA-binding is associated with impaired suture closing in the parietal foramina (OMIM 168500).<sup>9</sup> Another mutation, in the homeodomain-coding region, has been described in a family with amelogenesis imperfecta and impaired tooth eruption.<sup>10</sup> Different mouse models (null mutant mice,<sup>5</sup> transgenic mice bearing overexpression constructs<sup>11</sup> and gene mutations<sup>12,13</sup>) mimic the multiple craniofacial anomalies: precocious fusion of cranial bones, development of ectopic cranial bone,<sup>12</sup> or contrarily, persistent calvaria foramina and dental defects,<sup>5</sup> and reduction of bone ossification<sup>13</sup> and resorption.<sup>6</sup> The present investigation focuses on the physiopathology of enamel and periodontal tissues in a knockin transgenic mouse model.<sup>6</sup>

*MSX2* target-genes were first identified in osteoblasts.<sup>14</sup> *In vitro*, the transcriptional repressor activity of

Accepted for publication July 13, 2010.

Address reprint requests to Muriel Molla, D.D.S, MPhil, Ph.D., Laboratoire de Physiopathologie Orale Moléculaire, Centre de Recherche des Cordeliers, INSERM, UMRS 872, Université Paris-Diderot, Equipe 5, Esc. E-2ème étage, 15-21 rue de l'école de Médecine, F-75270 Paris Cedex 06, France. E-mail: murielmolla@gmail.com.

MSX2 was shown to be mediated through interactions with distinct transcriptional factors such as DLX homeo-proteins for osteocalcin<sup>15</sup> and the CCAAT/enhancer-binding protein  $\alpha$  (C/EBP $\alpha$ ) for amelogenin.<sup>16</sup> In osteoblasts, MSX2 exerts either positive or negative effects on osteocalcin transcriptional activity depending on the stage of osteoblast differentiation and thus diverse MSX2 transcriptional partners.<sup>17–19</sup> Therefore, the impact of MSX2 depends on the cellular circumstances. Recent *in vivo* studies addressed the role of MSX2 in late postnatal growth and adult homeostasis.<sup>3,6</sup> These studies demonstrated additional roles for MSX2 in physiological regulation of postnatal mineralized tissue formation, modeling and homeostasis. In addition to enamel and dentin dysplasia and altered root formation, these mutant mice exhibit regional osteopetrosis resulting from site-specific down-regulation of RANKL expression in the alveolar bone<sup>6</sup> which mechanisms are not understood.

In addition to osteocalcin and amelogenin, other enamel matrix proteins constitute candidate MSX2 targets. Their aberrant expression is hypothesized here to underlie the broad dento-alveolar spectrum of alterations associated with *Msx2* mutation. Indeed, enamel proteins could play a dual role in mineralized tissues, acting both as a structural scaffold for amelogenesis and as signaling molecules for mineralized tissue formation and resorption. Amelogenin proteins self-assemble into nanospheres and coils which serve as an enamel scaffold.<sup>20</sup> These transient self-assemblies run throughout the enamel layer and guide apatite crystal formation and growth.<sup>21,22</sup> Amelogenin null mice show a significant reduction of enamel thickness which is in addition devoid of prismatic pattern.<sup>23</sup> Two other enamel proteins, enamelin and ameloblastin, also cooperate in enamel morphogenesis, as shown by their extracellular distribution in forming enamel and the phenotype of their respective null mutants.<sup>24,25</sup> On the other hand, dentin sialophosphoprotein (DSPP) is transiently expressed in presecretion-stage ameloblasts and initiates enamel biomineralization.<sup>26</sup> Therefore, these four enamel proteins (amelogenin, enamelin, ameloblastin, and DSPP) cooperate in the control of biomineralization events and are essential for enamel morphogenesis. Isolated amelogenesis imperfecta, which comprises a family of hereditary diseases affecting enamel structure, including hypoplastic, hypomaturational, and hypomineralization types, is associated with mutation of the corresponding genes in humans.<sup>27</sup>

Besides their role as structural proteins, amelogenin and ameloblastin isoforms are proposed to play a role in cell signaling.<sup>28</sup> Amelogenin peptides were shown to induce bone-cell differentiation via Runx-2 pathway activation *in vivo* and *in vitro*.<sup>29,30</sup> Amelogenin null mutants show regional hyperresorption mediated by activation of RANKL-RANK pathway.<sup>31,32</sup> Interestingly, the amelogenin gene was one of the first identified MSX2 target-genes for which transcriptional repression was deciphered at the molecular level.<sup>33</sup> While this *in vitro* MSX2 action has been well documented, no *in vivo* studies have been performed regarding the relationship between MSX2 expression and enamel proteins.

Based on MSX2 transcriptional repression of the amelogenin gene established *in vitro* and the potential functions of enamel proteins, the purpose of this study was to scrutinize enamel proteins *in vivo* in *Msx2* mutant mice. Postnatal phenotypes were compared in *Msx2*<sup>+/+</sup> (wild type), *Msx2*<sup>+/-</sup> (heterozygous) and *Msx2*<sup>-/-</sup> (homozygous) mice. MSX2 and enamel proteins were analyzed in the dental epithelium throughout its life cycle: enamel organ during amelogenesis, Hertwig's root sheath during root formation, and Malassez remnants in the adult periodontium. An inverse relationship was observed between *Msx2* gene dosage and expression levels of enamel-related genes in the dental epithelium. Our data revealed the existence of a beneficial impact of loss of a single *Msx2* allele on enamel formation in *Msx2*<sup>+/-</sup> mice which was not previously described. In *Msx2*<sup>-/-</sup> mice, the data suggest a parallel relationship between epithelial amelogenin and ameloblastin levels and alveolar bone and cementum homeostasis.

## Materials and Methods

### Expression Analysis in Knockin *Msx2/lacZ* Transgenic Mice

Knockin mice were produced by insertion of the bacterial *lacZ* gene within the *Msx2* gene, replacing the coding sequence.<sup>6</sup> Heterozygous males and females were mated using a CD1 Swiss genetic background. Their litters were used to compare wild-type (*Msx2*<sup>+/+</sup>), transgenic heterozygous (*Msx2*<sup>+/-</sup>) and homozygous (*Msx2*<sup>-/-</sup>) mice. All experiments were performed in accordance with the French National Consultative Bioethics Committee for Health and Life Science, following the ethical guidelines for animal care. All experiments were performed by staff trained to conduct *in vivo* studies.

### RNA Extraction and RT-qPCR

Twenty-one 3-month-old mice were used for each group (*Msx2*<sup>+/+</sup>, *Msx2*<sup>+/-</sup>, and *Msx2*<sup>-/-</sup>). Half mandibles were removed, quickly frozen in liquid nitrogen and ground up. Dental epithelial cells of the continuously erupting incisor and alveolar bone were microdissected out under a stereomicroscope. The cervical loops were excised to avoid mesenchymal contamination. Three pools including three different animals per pool were generated. Total RNA was extracted using a Trizol reagent kit (Invitrogen, Cergy-Pontoise, France) according to the manufacturer's protocol. After total RNA quantification, equal amounts of RNA (1  $\mu$ g) were transcribed into cDNA using SuperScript II RNase H reverse transcriptase (Invitrogen) with oligo-dT and hexanucleotide random primers. Gene expression levels were determined by real-time PCR using specific primers (Table 1). Optimal conditions and cDNA dilutions were determined for each gene. q-PCR experiments were performed with a Roche LightCycler in triplicate using FastStart DNA Master SYBR Green I (Roche, Neuilly-sur-Seine, France).

**Table 1.** Primer Sequences and PCR Conditions Used for RT-qPCR Analysis

Gene	Oligonucleotides	Size (bp)	Tm (°C)
<i>Amelogenin</i>			
P1	5'-GGATCAAGCATCCCTGAGTTTCAAAC-3'	370	60
P2	5'-ATCATTTGGTTGCTGGGGATCAC-3'		
<i>Ameloblastin</i>			
P1	5'-CACTTACTATCCTTCCGCAG-3'	181	58
P2	5'-GTGCTGACACTTAGACTTTGC-3'		
<i>Enamelin</i>			
P1	5'-TCGGAGGGATGTTCTGAAAC-3'	232	58
P2	5'-AGGACTTTCAGTGGGTGTGG-3'		
<i>MSX2</i>			
P1	5'-CCTGAGGAAACACAAGACCA-3'	278	60
P2	5'-AGTTGATAGGGAAGGCAGA-3'		
<i>Laminin5α3</i>			
P1	5'-GGGTGTGACCAAAAAGTGCT-3'	206	58
P2	5'-CATCTTCCAGGGTGACCAGT-3'		
<i>Cytokeratin 5</i>			
P1	5'-TCAAGAAGCAGTGTGCCAAC-3'	217	58
P2	5'-TCCAGCAGCTTCTGTAGGT-3'		
<i>DSPP</i>			
P1	5'-ACAAGAGTGGGACCCTGTTT-3'	399	58
P2	5'-TACAGTGTGGGCGTTACAAC-3'		

### Scanning Electron Microscopy Analysis of Mandible Incisor and Molar Enamel

Six mandibles from 3-month-old *Msx2*<sup>+/+</sup>, *Msx2*<sup>+/-</sup> and *Msx2*<sup>-/-</sup> mice were fixed for 24 hours in 4% paraformaldehyde in PBS, pH 7.4. Samples were then cut along the frontal axis into two fragments before the first molar by using a rotating diamond wheel. Previous microscanner analysis was used to validate the cutting axis (perpendicular to incisor axis). Dehydration was performed using increasing concentrations of ethanol for 24 to 48 hours each at 4°C. Each fragment was embedded in calibrated cylinders with clear polyester resin. The first fragment, corresponding to the buccal part of the incisor, was ground through bone emergence using optically controlled monitoring. The second fragment was ground until the mesial surface of the first molar appeared. Sample surfaces were polished with sandpaper of successively decreasing grits. Conditioning of the enamel surface was achieved by etching with 37% phosphoric acid for 10 seconds. Each sample was coated with palladium-gold in a vacuum evaporator and observed with a scanning electron microscope (JSM-6400, JEOL, Tokyo) at 10 kV. The morphology of incisor was used as a criteria to calibrate the section planes based on the established  $\mu$ CT landmarks.

### Sample Preparation for Histomorphology, in Situ Hybridization, and Immunolabeling

*Msx2*<sup>+/+</sup>, *Msx2*<sup>+/-</sup>, *Msx2*<sup>-/-</sup> mouse mandibles (four animals for each group, at ages 1, 2, 3, 6, 12, and 24 weeks) were dissected out, fixed by immersion in 4% paraformaldehyde for 24 hours at 4°C, and rinsed in PBS. Half of the samples were decalcified at 4°C with EDTA (4%) for 4 to 64 weeks, depending on mouse age. Right half-mandibles were rinsed, dehydrated and embedded in paraffin for sectioning. Sections of 7  $\mu$ m were deparaf-

finized and rehydrated before being stained with hematoxylin and eosin for histological analysis or subjected to immunohistology. For the left half-mandibles, 10- $\mu$ m cryostat sections without decalcification were made with a Leica CM 3050S Microtome (Leica, Rueil-Malmaison, France) and deposited onto poly-L-lysine (Sigma)-coated slides, dehydrated in a graded series of ethanol, and stored at -20°C.

### In Situ Hybridization

Amelogenin sense and antisense RNA probes were prepared from full-length cDNA (covering exons 2-3-5-6-7; see Bonass et al<sup>34</sup>), subcloned into a Bluescript plasmid and linearized with XhoI or PstI endonucleases.

For radioactive *in situ* hybridization, [<sup>35</sup>S]UTP-labeled single-stranded antisense and sense probes were synthesized using T7 and T3 RNA polymerase, respectively (Boehringer, Meylan, France).<sup>34</sup> For nonradioactive *in situ* hybridization, the same probes were labeled with UTP-digoxigenin (Roche, France).

Radioactive *in situ* hybridization was performed as previously described by Hotton et al<sup>35</sup> on non-decalcified samples. Briefly, cryostat sections were pretreated with proteinase K (Sigma), hybridized with 20  $\mu$ l of labeled probes containing 60,000 cpm/ $\mu$ l in a humid chamber overnight at 50°C, and washed under high-stringency conditions. The slides were dipped into NTB2 autoradiographic emulsion (Kodak, Paris, France) and exposed from 2 to 4 weeks at 4°C. After developing the film, the sections were stained with hematoxylin, dehydrated, and mounted under a coverslip. The sections were examined and photographed using a DRMB photomicroscope (Leica, France) under bright- and dark-field illumination.

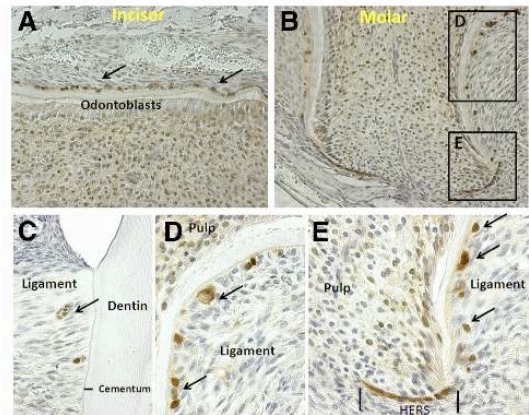
For nonradioactive *in situ* hybridization, sections were deparaffinized, dehydrated, and hybridized overnight with 50  $\mu$ l of labeled probe (1 ng/ $\mu$ l) in a dark, humid chamber. The reaction was revealed by immu-



nocytochemistry using an anti-digoxigenin alkaline phosphatase-conjugated polyclonal antibody (Vector NovaRED; Abcsyss, Paris, France). The sections were then stained with Mayer's hematoxylin and dehydrated before being mounted under a coverslip and photographed.

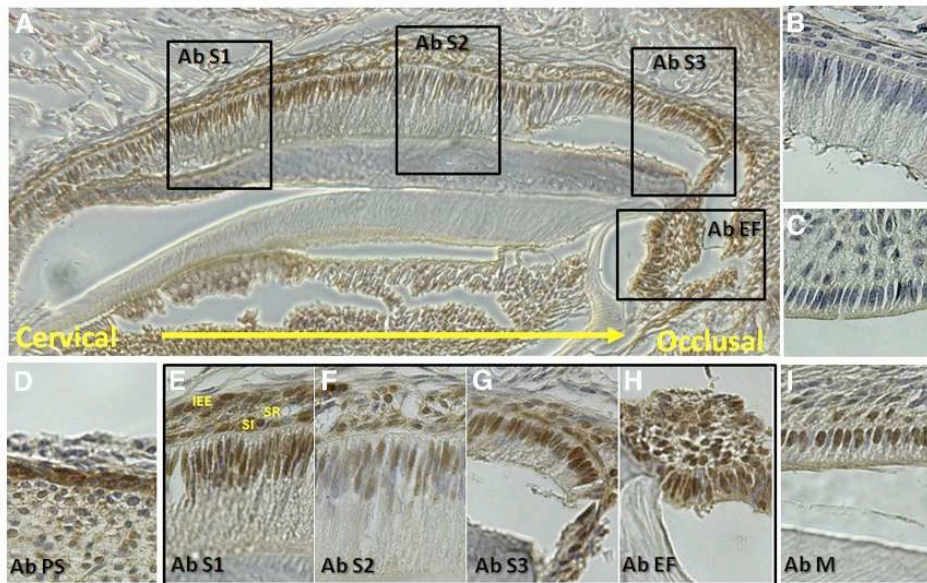
*Immunohistochemistry*

Deparaffined and rehydrated sections were incubated for 30 minutes in 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/PBS to quench endogenous peroxidase activity, and then rinsed for 10 minutes in PBS. Nonspecific protein binding was blocked by incubation for 30 minutes in 10% normal goat serum and 1% bovine serum albumin in PBS. Specimens were incubated for 1 hour at room temperature in a humidified chamber with a polyclonal rabbit anti-mouse  $\beta$ -galactosidase antibody (Genetex), anti-amelogenin (generous gift of Pr. S. Sasaki, Tokyo Medical and Dental University, Department of Biochemistry, diluted at 1:1000) and anti-ameloblastin (generous gift of Pr. Tilmann Wurtz, Centre de Recherche des Cordeliers, Paris, France; diluted at 1:1400). Sections were then washed extensively three times in PBS at room temperature before treatment for 30 minutes at room temperature with the secondary biotin-labeled goat anti-rabbit IgG antibody (StrAviGen Multilink kit, Biogenex, UK) for  $\beta$ -galactosidase, and with horseradish peroxidase goat anti-rabbit IgG antibody (DAKO) for



**Figure 2.** Immunolocalization of  $\beta$ -galactosidase protein in *Mx2* knock-in heterozygous mouse root. Epithelial life cycle is followed in an incisor (A) and first molar (B-E). Different cells are recognized according to their morphology and position. At postnatal week 2, MSX2 expression is evident in odontoblasts, pulp cells, ERM (arrows), and Hertwig epithelial root sheath (between the vertical black lines). HERS, Hertwig epithelial root sheath. Black rectangles in B are shown enlarged in D and E.

amelogenin and ameloblastin. Subsequently, sections were incubated for 30 minutes at room temperature with peroxidase linked to avidin (Vectastain ABC kit, Vector Laboratories, Burlingame, CA) for  $\beta$ -galactosidase, and



**Figure 1.** Immunolocalization of  $\beta$ -galactosidase protein in *Mx2* knock-in heterozygous mutant mouse molar crown. MSX2 expression is shown labeled in brown at 1 (A, D, H) and 2 (B, C, I) postnatal weeks. A represents a sagittal view of a molar, with the cervical area on the left and the occlusal part on the right. Black rectangles are enlarged in E-H. Ameloblast stage was determined according to their morphology and location in the molar crown. At 1 week, most ameloblasts are at the secretion stage while at 2 weeks, most of the ameloblasts are at the maturation stage. Ab PS, prescretion stage ameloblasts; Ab S1, secretion stage ameloblasts in 3 areas: Ab S1 corresponds to the cervical part of the crown where enamel thickness is reduced, Ab S2 corresponds to the middle part of the crown where enamel thickness is greatest, and Ab S3 corresponds to the cusp area where enamel thickness decreases. Ab EF, ameloblast facing the enamel-free area; Ab M, maturation stage ameloblasts; IEE, inner enamel epithelium; SR, stellate reticulum; SI, stratum intermedium. Strong labeling is noted in prescretion stage ameloblasts (D) and in ameloblasts facing the enamel-free area in the occlusal crown (H). In secretion stage ameloblasts, labeling decreases with enamel thickness: at the middle region of the crown, corresponding to the thickest enamel layer, brown labeling is less intense (Ab S2, F); at the cervical and occlusal parts of the crown where the enamel layer is thinner, labeling is stronger (Ab S1 and Ab S3, E-G). Experiments without primary antibody are controls (B and C).

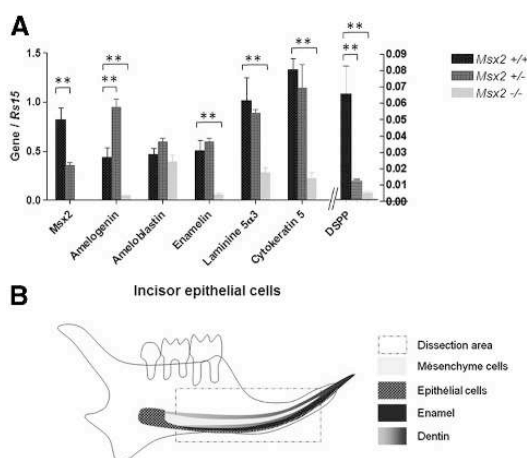
with a NovaRED kit (Vector Laboratories) for amelogenin and ameloblastin. After rinsing in PBS, the immunoreactivity was visualized by development for 2 to 10 minutes with 0.1% 3,3-diaminobenzidine and 0.02% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (DAB substrate kit, Vector Laboratories). For  $\beta$ -galactosidase analysis, sections were counterstained with Mayer's hematoxylin, mounted with permanent mounting medium (XAM, BDH Laboratory, England) and examined by light microscopy. Amelogenin and ameloblastin labeling samples were not counterstained but mounted with aqueous medium (Labonord, Lille). A positive control was performed on untreated mouse teeth and a negative control on mouse oral mucosa. A further negative control experiment that omitted primary antibody was also performed on mouse tooth sections.

## Results

### MSX2 Expression in Odontogenic Cells

MSX2 expression was analyzed during the first 4 postnatal months in the mandibular first molar of *Msx2*<sup>+/-</sup> mice by using  $\beta$ -galactosidase immunostaining. Developmental stages of ameloblasts have been identified based on their cell morphology. Presecretion stage ameloblasts are short, and are adjoining differentiated mesenchymal cells forming predentin and dentin with no enamel deposition. Secretion stage ameloblast are polygonal and elongated with a large basal nucleus and distal Tomes processes. Enamel deposition is visible. Maturation stage ameloblasts do not possess Tomes process, become abruptly much shorter and reduced in size. The enamel thickness is stable.

During amelogenesis (Figure 1), MSX2 expression was stronger in presecretion-stage ameloblasts (Ab PS) (Figure 1D) and in mature, postsecretion-stage ameloblasts (Ab M) (Figure 1I) than in secretion-stage ameloblasts (Ab S) (Figure 1, A, D–H). Figure 1, B and C, show controls without primary antibody. Ab S1, S2, and S3 represent secretion-stage ameloblasts adjoining enamel area with different thicknesses, in the cervical part, the middle to upper part, and the occlusal part of the molar crown, respectively. In secretion-stage ameloblasts, MSX2 expression appeared to be less intense in areas of greater enamel thickness (Ab S2 versus Ab S1 and Ab S3). Strong MSX2 expression was observed in zones of mouse molar corresponding to enamel-free areas (Ab EF). MSX2 expression was also detected in forming and adult periodontium. During root elongation, MSX2 was expressed in Hertwig epithelial root sheath and, after its disruption, in epithelial rests of Malassez (ERM) (Figure 2, A–E). Epithelial rests of Malassez cells continued to express significant levels of *Msx2* in adults. Quantitative analysis of *Msx2* transcripts in ameloblasts (Figure 3) validated the absence of *Msx2* transcripts in *Msx2*<sup>-/-</sup> mice and a half reduction in *Msx2*<sup>+/-</sup> heterozygous mice as compared to *Msx2*<sup>+/+</sup> control mice. These results indicate the occurrence of a haploinsufficiency phenomenon in heterozygous mice.

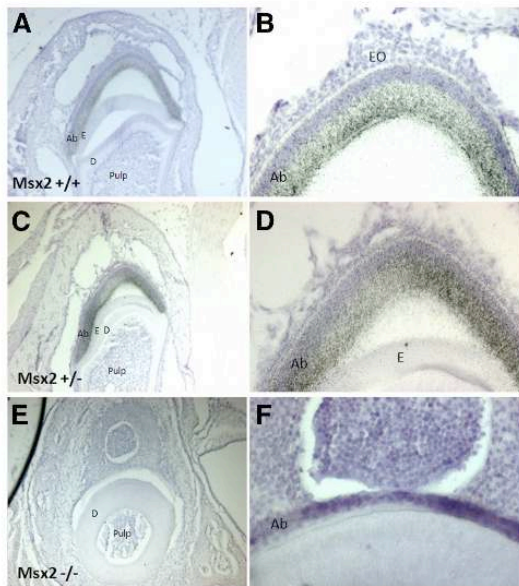


**Figure 3.** Quantitative RT-PCR analysis of *Msx2* (A) and enamel mRNA isolated from microdissected incisor epithelial cells in *Msx2*<sup>+/+</sup>, *Msx2*<sup>+/-</sup>, and *Msx2*<sup>-/-</sup> 12-week-old mice (B). Each level of mRNA expression is normalized with stable ribosomal protein Rpl15 mRNA. The histograms show the mean  $\pm$  SEM of data obtained from nine mandibles for each group (in triplicate). Significance was evaluated using the Mann-Whitney test (\**P* < 0.05, \*\**P* < 0.0005).

### *Msx2* Dosage Regulates Enamel Proteins

To estimate the variation in the levels of the mRNAs encoding enamel proteins in relationship to MSX2 expression levels, dental epithelium was microdissected from mouse mandible incisor and total mRNA was isolated. To analyze mRNA expression in a homogenous population of ameloblasts, the cervical loop was carefully removed. Levels of mRNA encoding amelogenin, ameloblastin, laminin 5 $\alpha$ 3, cyto keratin 5, and DSPP were measured by RT-qPCR in *Msx2*<sup>-/-</sup>, *Msx2*<sup>+/-</sup> and *Msx2*<sup>+/+</sup> mice. The amelogenin primers were chosen to amplify the M180 major transcript. As expected, sequencing revealed that the amplified amelogenin cDNA contained exons 2, 3, 5, and 6. In *Msx2*<sup>+/-</sup> heterozygous mice, only the modulation of amelogenin expression was found to be statistically significant among all enamel protein-encoding genes. As shown in Figure 3, amelogenin expression increased twofold in heterozygous mice as compared to wild type. In contrast, *Dspp* transcript expression was significantly reduced in heterozygous mice. In *Msx2*<sup>-/-</sup> null mice, the amounts of amelogenin, enamelin, laminin 5 $\alpha$ 3, cyto keratin 5, and *Dspp* mRNA were all significantly decreased, whereas no significant variation of ameloblastin mRNA was observed.

To localize amelogenin mRNA expression in secretion-stage ameloblasts, *in situ* hybridization was performed on incisor sections of 21-day-old mouse mandible (Figure 4, A and B). mRNA labeling was stronger in *Msx2*<sup>+/-</sup> (Figure 4, C and D) than in *Msx2*<sup>+/+</sup> mice (Figure 4, A and B). Scattered ectopic mRNA was observed in stratum intermedium cells. In *Msx2* null mice, no significant hybridization signal was detected in incisor (Figure 4E) as expected because of the complete disappearance of ameloblasts. Detailed analysis in molar showed some areas with few ameloblasts corresponding to irregular



**Figure 4.** Radioactive *in situ* hybridization of amelogenin mRNA in *Msx2*<sup>+/+</sup>, *Msx2*<sup>+/-</sup>, and *Msx2*<sup>-/-</sup> mouse incisors at 21 postnatal days. In *Msx2*<sup>+/+</sup> mice, amelogenin expression is located in the cell body of secretion-stage ameloblasts (A and B). In *Msx2*<sup>+/-</sup> mutant mice, labeling is stronger (C and D). In *Msx2*<sup>-/-</sup> mutant mice, amelogenin labeling was absent, as expected (E and F). Ameloblasts are not polarized or rounded (F). Ab, ameloblast; E, enamel; D, dentin; EO, enamel organ.

amelogenin labeling (Figure 4F). Indeed, some polarized ameloblasts were present in the cervical area, whereas in the most occlusal part, epithelial cells in contact with dentin showed no evidence of ameloblast polygonal structure and organization, but rather a shorter and round morphology (Figure 4F).

Histological studies of *Msx2*<sup>-/-</sup> mouse mandibular molars showed anomalies of root-tissue development inducing root dysmorphology, with a gradient of severity from the third to the first molar. In the first molar the root dentin was formed and no obvious anomaly was observed until day 10 (data not shown). The second molar exhibited in some areas a total absence of root dentin formation and a massive cellular cementum-like structure (hypercementosis). Some ectopic mineralized tissue was seen in the pulp chamber. The third molar showed a complete root shape and structural disorganization. Moreover in all molars, hypertrophy of epithelial cells was observed at several sites. The first major site was localized adjacent to the crown-root junction and the second was more diffuse. These cells comprised clusters of only a few cells termed the ERM in wild-type mice (Figure 5, G and H). This analysis revealed three different sizes of cluster in *Msx2* null mutant mice: small ones composed of two or three cells (as in wild type), medium ones composed of five or six cells, and giant ones composed of more than 10 cells. The bigger these islands, the more extracellular matrix was present and the more the cells were enlarged. Histomorphometric analysis was performed

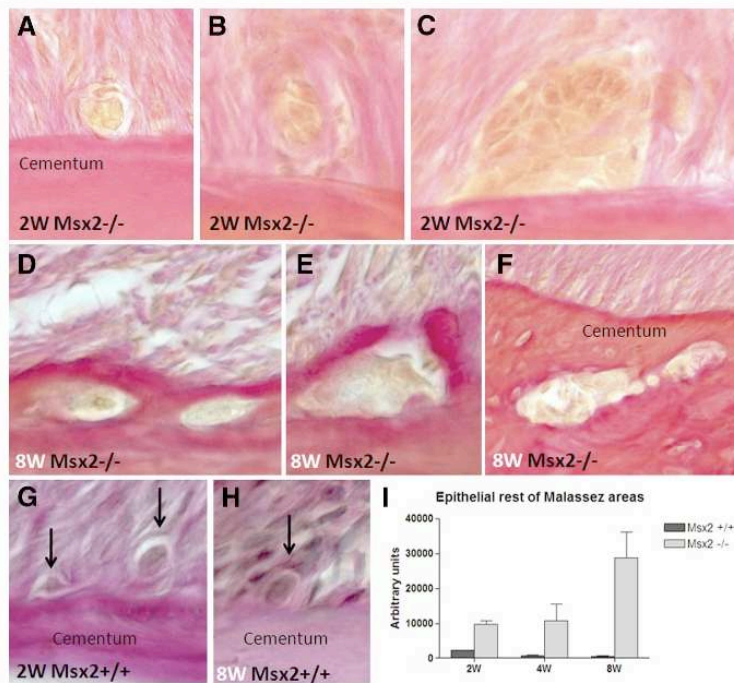
with image analysis software to calculate the area occupied by and the number of epithelial cluster cells along the roots (Figure 5I). In *Msx2*<sup>-/-</sup> mice, these clusters appeared less numerous but much larger than in wild-type mice and their size appeared to increase with age (4.6-fold at 2 postnatal weeks, Figure 5, A-C; 14-fold at 4 postnatal weeks; 30-fold at 8 postnatal weeks, Figure 5, D-F). At 2 to 6 months most of these clusters were entrapped in the cellular cementum (Figure 5, D-F). In addition, *in situ* hybridization and immunolabeling showed that they overexpressed both amelogenin and ameloblastin (Figure 6, B-E) compared to wild type (Figure 6A).

### SEM Analysis of *Msx2*<sup>+/+</sup>, *Msx2*<sup>+/-</sup> and *Msx2*<sup>-/-</sup> Mouse Enamel

For comparison, the corresponding areas of mature enamel in *Msx2*<sup>+/+</sup>, *Msx2*<sup>+/-</sup> and *Msx2*<sup>-/-</sup> mouse mandible incisors are shown in Figure 7. The thickness of the enamel layer differed between the three mouse genotypes. The enamel layer of the *Msx2*<sup>-/-</sup> null mouse was markedly reduced (2.6-fold) (Figure 7E), whereas the thickness of the enamel layer in the heterozygous mouse was increased 1.3-fold (Figure 7C). In addition to this thickness modification, the enamel had a different structural pattern in the different genotypes. In the *Msx2* null mouse, the enamel was reduced to a thin layer, homogeneous in structure with cracks inside and lacking its usual prismatic appearance (Figure 7F). Heterozygous mice showed a regular prismatic structure similar to normal enamel with rods cut in alternating sagittal and transversal orientations (Figure 7C). Yet, some differences were noticed. The external prismatic enamel layer, in which all prisms were cut transversally, was much larger in the heterozygous mouse tooth than in the wild-type mouse tooth (increasing twofold) (Figure 7, A-D). Most of the enamel body consists of rod and inter-rod enamel. Rods present a classical keyhole shape when they are transversally cut. Each rod is separated with inter-rod enamel connecting to the rod on one side. *Msx2*<sup>+/-</sup> heterozygous mice exhibited much larger prisms (2.7 ± 0.2 μm in width in *Msx2*<sup>+/-</sup> mice versus 1.9 ± 0.2 μm in *Msx2*<sup>+/+</sup> mice) (Figure 7, G and H).

### Discussion

Disruption of one (*Msx2*<sup>+/-</sup>) or two (*Msx2*<sup>-/-</sup>) copies of the *Msx2* gene led to specific abnormalities in teeth. In the *Msx2*<sup>+/-</sup> mouse, both enamel thickness and amelogenin expression in ameloblasts were increased. In *Msx2*<sup>-/-</sup> mice, epithelial cells showed divergent alterations in the crown and root: reduced expression of enamel matrix proteins in the crown was associated with the disappearance of ameloblasts, whereas in the root, epithelial Malassez cells accumulated progressively throughout postnatal growth and in adult periodontium (the calculated area of the ERM was increased 4.6-fold at 2 postnatal weeks and 30-fold at 8 postnatal weeks). The latter cells formed hypertrophic islands (showing increased width and numbers of

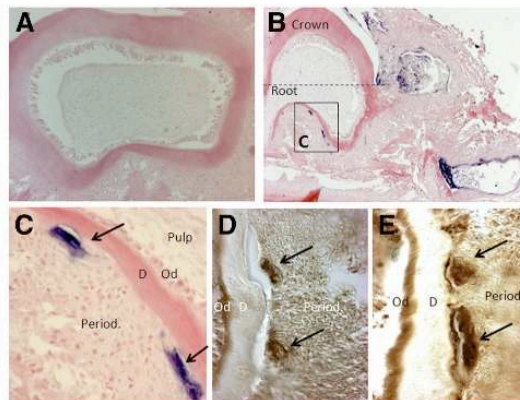


**Figure 5.** Analysis of epithelial rest of Malassez in *Msx2*<sup>+/+</sup> and *Msx2*<sup>-/-</sup> mouse molars. Pictures represent epithelial cells in the periodontal ligament along root, in contact to cementum. Epithelial clusters were analyzed at 2 weeks (**A–C**), 4 weeks (not shown), and 8 weeks (**D–F**) in *Msx2*<sup>+/+</sup> mice versus controls (2 weeks, **G**; 8 weeks, **H**). Surface areas were measured on four different first mandibular molars from *Msx2*<sup>+/+</sup> and *Msx2*<sup>-/-</sup> mice along the root length. These measurements were performed at 2, 4, and 8 postnatal weeks. In *Msx2* null-mutant mice, three types of clusters could be observed: **A**, a small cluster with only a few cells, similar to the clusters in wild-type mice; **B**, medium-sized with 5–6 cells; and **C**, a large cluster including more than 10 cells. At 8 postnatal weeks, most of the cell clusters are included in cementum (**D–F**). In wild-type mice, epithelial rest of Malassez are present all along the root and composed of one or very few cells at 2 weeks (**G**, arrows), 4 weeks (not shown), and 8 weeks (**H**, arrow). Image analysis software (Image J) was used to measure epithelial cell areas (**I**). ERM areas increased from 2 weeks (ratio *Msx2*<sup>-/-</sup> versus *Msx2*<sup>+/+</sup> = 4) to 4 weeks (ratio = 14) to 8 weeks (ratio = 30).

cells) that overexpressed enamel proteins at both the mRNA and protein levels.

#### *MSX2—A Regulator of Enamel Architecture via Transcriptional Control of Amelogenin Levels*

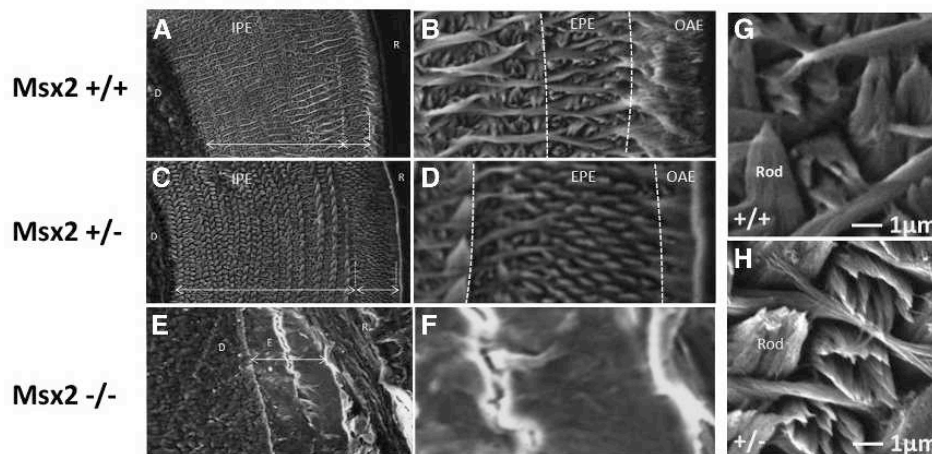
The amelogenin promoter harbors five response elements containing canonical TAATT-binding motifs for



**Figure 6.** Amelogenin and ameloblastin expression in *Msx2*<sup>+/+</sup> (**A**) and *Msx2*<sup>-/-</sup> (**B–E**) mice at 3 postnatal weeks. **A–C**: Nonradioactive *in situ* hybridization to amelogenin mRNA reveals a significant increase in giant ERM in *Msx2*-null mutants (arrows). **D** confirms increased amelogenin protein expression by immunoperoxidase staining (arrows). **E** shows significant ameloblastin protein levels by immunoperoxidase staining in the same ERM (arrows). Such intensity of amelogenin and ameloblastin immunolabeling is not observed in wild-type mice (data not shown); D, dentin; Od, odontoblast; Period., periodontium.

both MSX and DLX homeoproteins.<sup>36</sup> Four DLX genes are expressed in ameloblasts.<sup>36,37</sup> *In vitro*, both positive and negative DLX effects on amelogenin promoter activity were shown to depend on the identified homeodomain-binding sites. In contrast, MSX2 behaves as a repressor of the amelogenin promoter,<sup>33,38</sup> in part by antagonizing C/EBP $\alpha$ .<sup>16</sup> These *in vitro* findings motivated the present investigation. Here, the observed increased level of amelogenin expression in *Msx2*<sup>+/-</sup> ameloblasts is interpreted as resulting from reduced transcriptional repressor activity of MSX2. Indeed, *Msx2* RNA levels mirrored *Msx2* gene copy number (that is [*Msx2*<sup>+/+</sup>] > [*Msx2*<sup>+/-</sup>] > [*Msx2*<sup>-/-</sup>] = 0; this study and Berdal et al<sup>3</sup>). Amelogenin mRNA was increased twofold in *Msx2*<sup>+/-</sup> mice compared to wild-type mice. For other molecular species, such as matrix (ameloblastin, enamelin), cytoskeletal (cytokeratin 5) and cell adhesion (laminin 5 $\alpha$ 3) proteins, no significant differences were found between the heterozygous and wild-type mice.

On the other hand, we found that the cells with the highest levels of MSX2 expression were not actively forming enamel matrix or producing significant amounts of amelogenin. These cells include presecretion- and maturation-stage ameloblasts,<sup>39</sup> enamel-free zone ameloblasts<sup>40</sup> and, even more strikingly, the cells of the Hertwig root sheath<sup>41</sup> and ERM.<sup>42</sup> This suggests that MSX2 downregulation is a prerequisite for significant enamel deposition, exclusively realized by secretion-stage ameloblasts. Indeed, the present data establish a link between MSX2-controlled amelogenin levels and enamel morphogenesis (regional enamel thickness and rod/inter-rod proportion). An increase of approximately 1.3-fold in



**Figure 7.** Scanning electron microscopy of transverse sections of mature enamel incisor (sagittal view) from *Msx2*<sup>+/+</sup>, *Msx2*<sup>+/-</sup>, and *Msx2*<sup>-/-</sup> mice at 3 postnatal months. The accuracy of each section location was established by the size and shape of incisor enamel and dentin, based on a preliminary study using microCT-3D reconstruction (data not shown). Compared to the situation in wild type (A), enamel thickness is higher ( $\times 1.3$ ) in *Msx2*<sup>+/-</sup> mice (C) and lower in *Msx2*<sup>-/-</sup> mice ( $\times 0.38$ ) (E). The most significant difference between *Msx2*<sup>+/+</sup> (B) and *Msx2*<sup>+/-</sup> (D) enamel is observed for the external prismatic enamel (between the dashed lines). *Msx2*-null mutants show a hypoplastic enamel dysplasia with absence of rods and many internal cracks (F). Compared to wild type (G), in *Msx2*<sup>+/-</sup> mutant mice the rods are modified (H). Prism width was  $1.9 \pm 0.2 \mu\text{m}$  in wild-type mice, and  $2.7 \pm 0.2 \mu\text{m}$  in heterozygous mice, as established by analysis of 20 different areas of the inner prismatic enamel. The external prismatic enamel layer (EPE) is much larger in *Msx2*<sup>+/-</sup> than in *Msx2*<sup>+/+</sup> mice. E, enamel; D, dentin; R, resin; OAE, outer aprismatic enamel; IPE, inner prismatic enamel; IRo, inter-rod rod enamel.

enamel thickness and shifting of the rod/inter-rod proportion in favor of the rods was documented in *Msx2*<sup>+/-</sup> mice (rods were enlarged to  $2.7 \mu\text{m}$  in the heterozygous genotype versus  $1.9 \mu\text{m}$  in wild type). Divergent phenotypes *in vivo* also suggest that amelogenin levels control enamel thickness and rods. In amelogenin<sup>-/-</sup> mice, enamel is considerably reduced in thickness and loses its rod structure.<sup>23</sup> This phenotype is also observed to a lesser extent in vitamin D-deficient rats, in which lower amelogenin levels led to a decrease in both the rod/inter-rod ratio and enamel thickness.<sup>39</sup> Consistent with this, in secretion-stage ameloblasts, MSX2 (as shown previously for DLX2<sup>43</sup>) was variably down-regulated, depending on the enamel thickness. The MSX2 (and DLX2<sup>36</sup>) expression gradient mirrors the amelogenin and enamel thickness patterns.

The present study revealed a key role for MSX2 in amelogenin repression, and suggests two functions for MSX2 *in vivo*: i) up-regulation of MSX2 would limit amelogenin production and block enamel deposition in other cell stages and types than secretion stage ameloblasts; and ii) during the enamel matrix deposition, MSX2 controls enamel thickness and rod morphogenesis. In conclusion, MSX2 regulates enamel architecture, as previously documented for developmental genes in mineralizing tissues<sup>44</sup> in our group.

#### Physiopathological Triad of Hypoplastic Enamel Dysplasia in *Msx2*<sup>-/-</sup> Mice

In *Msx2*<sup>-/-</sup> mice, the enamel, when present, presented a reduced thickness ( $40 \pm 10 \mu\text{m}$  versus  $104 \pm 10 \mu\text{m}$  in wild type) and displayed an irregular surface. Enamel was confined to an amorphous layer without

rod architecture. Some cracks were observed in this thin enamel layer. Various genetic forms of amelogenesis imperfecta<sup>45</sup> are secondary to mutations in human genes (enamelin,<sup>46</sup> kallikrein 4,<sup>47</sup> and enamelysin<sup>48</sup>) and transgenic mouse lines.<sup>23,25,49-52</sup> Among these clinical disorders and experimental models, the enamels of *Msx2*<sup>-/-</sup> and amelogenin<sup>-/-</sup> mice harbor the most significant similarities, both corresponding to hypoplastic type of enamel defects. Similarly, enamelin null mutants show structural alterations in heterozygous mice and the absence of enamel in homozygous mutant mice.<sup>53</sup> Consistent with such phenotypes, the present RT-qPCR analysis revealed reduced expression of both amelogenin and enamelin in *Msx2*<sup>-/-</sup> mouse dental epithelium, whereas ameloblastin mRNA expression was unaffected.

In addition to enamel matrix defects, ameloblast differentiation was impaired in *Msx2*<sup>-/-</sup> mice. Ameloblasts lost their intercellular junctions, became round, and detached. Reduced amounts of mRNA encoding laminin 5 $\alpha$ 3 (as previously observed *in situ*<sup>7</sup>) and cytokeratin 5 were observed by RT-qPCR. In humans, mutation of the laminin 5 $\alpha$ 3 gene leads to epidermolysis bullosa, which is associated with enamel dysplasia and impaired tooth eruption as observed in *Msx2* null-mutant mice.<sup>6</sup> Laminin 5 is implicated in cell-cell junctions during ameloblast differentiation. Ameloblast anchorage to secreted matrix, membrane and mineral is crucial for rod orientation, structure, and mineralization.<sup>54</sup> Cytokeratin 5 is a component of intermediate filaments of epithelial tissues. Cytokeratin 5 binds to the amelogenin trityrosyl motif peptide (ATMP) sequence of amelogenin and is suspected to play a chaperone role for nascent amelogenin polypeptides.<sup>55</sup> Thus, the reduction of cytokeratin 5 expression

would additionally contribute to the enamel defects observed in *Msx2* null mice.

Therefore, it may be concluded that the enamel dysplasia results from a physiopathological triad in *Msx2*<sup>-/-</sup> mice: i) a progressive deficit of differentiated ameloblasts, which was shown here to vary between incisors and molars; ii) altered expression levels of cellular proteins involved in cell-cell junctions (laminin 5  $\alpha$ 3) and the amelogenin biosynthetic pathway (cytokeratin 5); iii) decreased levels of specific enamel-related species (amelogenin, enamelin, and DSPP, but not ameloblastin) in the extracellular matrix compartment.

### Overexpressed Enamel Proteins – Signals in *Msx2*<sup>-/-</sup> Mouse Periodontal Anomalies

Amelogenin function seems not to be restricted to a structural role. The first evidence of amelogenin signal function via Runx 2 activation was supplied by Arthur Veis Dental School of the Aristotle University of Thessaloniki, Thessaloniki, Greece.<sup>29</sup> A number of studies further supported this first experiment. Amelogenins are osteo-inductive in both fibroblasts<sup>29</sup> and embryonic stem cells.<sup>30</sup> In vitro studies assigned a function to amelogenins in cementum and alveolar bone remodeling.<sup>56–58</sup> Immortalized cementoblasts exposed to amelogenin overexpress bone sialoprotein (BSP) in a dose-dependent manner.<sup>59</sup> In bone cells, amelogenin severely inhibits osteoclastogenesis through down-regulation of RANKL, M-CSF, and fibronectin production by osteoblasts.<sup>60</sup> Conversely, *in vivo*, amelogenin<sup>-/-</sup> mice display cementum resorption and increased RANKL expression.<sup>23,31</sup>

In the periodontium of *Msx2* null-mutant mice, regional osteopetrosis and delayed tooth eruption were previously reported.<sup>6</sup> In the present study, transformation of ERMs into hypertrophic epithelial islands and neighboring hypercementosis were documented. This ended in young adults with the growth of cementum-bone-like tissue structures which entrapped giant epithelial islands within the roots. These epithelial cells appeared enlarged and produced amelogenin and ameloblastin even though enamel protein detection is technically difficult in postnatal periodontium at the basal level<sup>41,61</sup>. Evident enamel protein detection in epithelial root Malassez cells is related to physiopathological situations such as inflammation,<sup>62</sup> cementum repair and, here, periodontal defects in *Msx2* null mice. Alterations to dental hard tissues may have consequences in mastication function and could contribute to these periodontal defects.

Therefore, the MSX2 decreased and the overexpression of amelogenin and ameloblastin in continuously growing, giant epithelial islands and cells observed here play a role in the pluri-tissular alterations of *Msx2*<sup>-/-</sup> mouse periodontium: increased cementum, alveolar bone deposition (via increased Runx2 levels specifically in the alveolar bone, RT-qPCR data non shown), and decreased alveolar bone resorption (via decreased RANKL-ligand levels).<sup>6</sup>

To conclude, *Msx2*<sup>-/-</sup> mice encompass phenotypic characteristics of both isolated enamel dysplasia, because of the severe reduced expression in enamel struc-

ture genes (amelogenin, enamelin), and syndromic enamel dysplasia, through alterations in cell-cell junctions (laminin 5 $\alpha$ 3, cytokeratin 5). In addition, the enamel and periodontal phenotypes demonstrate a potential dual impact: both structural (enamel morphogenesis in *Msx2*<sup>+/-</sup> and *Msx2*<sup>-/-</sup> mutant mice) and signaling (periodontal positive balance in *Msx2*<sup>-/-</sup> mice) roles of enamel proteins in a physiopathological context.

### Acknowledgment

We thank Benoît Robert for providing the *Msx2/LacZ* transgenic mouse line.

### References

1. Alappat S, Zhang ZY, Chen YP: Msx homeobox gene family and craniofacial development. *Cell Res* 2003, 13:429–442
2. Catron KM, Wang H, Hu G, Shen MM, Abate-Shen C: Comparison of MSX-1 and MSX-2 suggests a molecular basis for functional redundancy. *Mech Dev* 1996, 55:185–199
3. Berdal A, Molla M, Holtton D, Aioub M, Lezot F, Nefussi JR, Goubin G: Differential impact of MSX1 and MSX2 homeogenes on mouse maxillofacial skeleton. *Cells Tissues Organs* 2009, 189:126–132
4. Catron KM, Iler N, Abate C: Nucleotides flanking a conserved TAAT core dictate the DNA binding specificity of three murine homeodomain proteins. *Mol Cell Biol* 1993, 13:2354–2365
5. Satokata I, Ma L, Ohshima H, Bei M, Woo I, Nishizawa K, Maeda T, Takano Y, Uchiyama M, Heaney S, Peters H, Tang Z, Maxson R, Maas R: *Msx2* deficiency in mice causes pleiotropic defects in bone growth and ectodermal organ formation. *Nat Genet* 2000, 24:391–395
6. Aioub M, Lezot F, Molla M, Castaneda B, Robert B, Goubin G, Nefussi JR, Berdal A: *Msx2*<sup>-/-</sup> transgenic mice develop compound amelogenesis imperfecta, dentinogenesis imperfecta and periodontal osteopetrosis. *Bone* 2007, 41:851–859
7. Bei M, Stowell S, Maas R: *Msx2* controls ameloblast terminal differentiation. *Dev Dyn* 2004, 231:758–765
8. Jabs EW, Muller U, Li X, Ma L, Luo W, Haworth IS, Klisak I, Sparkes R, Warman ML, Mulliken JB, et al.: A mutation in the homeodomain of the human MSX2 gene in a family affected with autosomal dominant craniosynostosis. *Cell* 1993, 75:443–450
9. Wuyts W, Reardon W, Preis S, Homfray T, Rasore-Quartino A, Christians H, Willems PJ, Van Hul W: Identification of mutations in the MSX2 homeobox gene in families affected with foramina parietalia permagna. *Hum Mol Genet* 2000, 9:1251–1255
10. Suda N, Kitahara Y, Ohyama K: A case of amelogenesis imperfecta, cleft lip and palate and polycystic kidney disease. *Orthod Craniofac Res* 2006, 9:52–56
11. Wu LY, Li M, Hinton DR, Guo L, Jiang S, Wang JT, Zeng A, Xie JB, Snead M, Shuler C, Maxson RE, Jr., Liu YH: Microphthalmia resulting from MSX2-induced apoptosis in the optic vesicle. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003, 44:2404–2412
12. Liu YH, Kundu R, Wu L, Luo W, Ignelzi MA, Jr., Snead ML, Maxson RE, Jr.: Premature suture closure and ectopic cranial bone in mice expressing *Msx2* transgenes in the developing skull. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995, 92:6137–6141
13. Winograd J, Reilly MP, Roe R, Lutz J, Laughner E, Xu X, Hu L, Asakura T, vander Kolk C, Strandberg JD, Semenza GL: Perinatal lethality and multiple craniofacial malformations in MSX2 transgenic mice. *Hum Mol Genet* 1997, 6:369–379
14. Cheng SL, Shao JS, Cai J, Sierra OL, Towler DA: *Msx2* exerts bone anabolism via canonical Wnt signaling. *J Biol Chem* 2008, 283:20505–20522
15. Newberry EP, Latifi T, Towler DA: Reciprocal regulation of osteocalcin transcription by the homeodomain proteins *Msx2* and *Dlx5*. *Biochemistry* 1998, 37:16360–16368
16. Xu Y, Zhou YL, Erickson RL, Macdougald OA, Snead ML: Physical dissection of the CCAAT/enhancer-binding protein alpha in regulat-

- ing the mouse amelogenin gene. *Biochem Biophys Res Commun* 2007, 354:56–61
17. Cheng SL, Shao JS, Charlton-Kachigian N, Loewy AP, Towler DA: MSX2 promotes osteogenesis and suppresses adipogenic differentiation of multipotent mesenchymal progenitors. *J Biol Chem* 2003, 278:45969–45977
  18. Ichida F, Nishimura R, Hata K, Matsubara T, Ikeda F, Hisada K, Yatani H, Cao X, Komori T, Yamaguchi A, Yoneda T: Reciprocal roles of MSX2 in regulation of osteoblast and adipocyte differentiation. *J Biol Chem* 2004, 279:34015–34022
  19. Lee MH, Kim YJ, Yoon WJ, Kim JI, Kim BG, Hwang YS, Wozney JM, Chi XZ, Bae SC, Choi KY, Cho JY, Choi JY, Ryoo HM: Dlx5 specifically regulates Runx2 type II expression by binding to homeodomain-response elements in the Runx2 distal promoter. *J Biol Chem* 2005, 280:35579–35587
  20. Moradian-Oldak J: Amelogenins: assembly, processing and control of crystal morphology. *Matrix Biol* 2001, 20:293–305
  21. Moradian-Oldak J, Du C, Falini G: On the formation of amelogenin microribbons. *Eur J Oral Sci* 2006, 114(Suppl 1):289–296, discussion 327–329, 382
  22. Fowler CE, Beniash E, Yamakoshi Y, Simmer JP, Margolis HC: Co-operative mineralization and protein self-assembly in amelogenesis: silica mineralization and assembly of recombinant amelogenins in vitro. *Eur J Oral Sci* 2006, 114(Suppl 1):297–303, discussion 327–329, 382
  23. Gibson CW, Yuan ZA, Hall B, Longenecker G, Chen E, Thyagarajan T, Sreenath T, Wright JT, Decker S, Piddington R, Harrison G, Kulkarni AB: Amelogenin-deficient mice display an amelogenesis imperfecta phenotype. *J Biol Chem* 2001, 276:31871–31875
  24. Fukumoto S, Kiba T, Hall B, Iehara N, Nakamura T, Longenecker G, Krebsbach PH, Nanci A, Kulkarni AB, Yamada Y: Ameloblastin is a cell adhesion molecule required for maintaining the differentiation state of ameloblasts. *J Cell Biol* 2004, 167:973–983
  25. Hu JC, Hu Y, Smith CE, McKee MD, Wright JT, Yamakoshi Y, Papagerakis P, Hunter GK, Feng JQ, Yamakoshi F, Simmer JP: Enamel defects and ameloblast-specific expression in Enam knock-out/lacZ knock-in mice. *J Biol Chem* 2008, 283:10858–10871
  26. MacDougall M, Nydegger J, Gu TT, Simmons D, Luan X, Cavender A, D'Souza RN: Developmental regulation of dentin sialophosphoprotein during ameloblast differentiation: a potential enamel matrix nucleator. *Connect Tissue Res* 1998, 39(1–3):25–37, discussion 63–67
  27. Wright JT: The molecular etiologies and associated phenotypes of amelogenesis imperfect. *Am J Med Genet A* 2006, 140:2547–2555
  28. Gruenbaum-Cohen Y, Tucker AS, Haze A, Shilo D, Taylor AL, Shay B, Sharpe PT, Mitsiadis TA, Ornoy A, Blumenfeld A, Deutsch D: Amelogenin in cranio-facial development: the tooth as a model to study the role of amelogenin during embryogenesis. *J Exp Zool B Mol Dev Evol* 2009, Jul 15; 312 B (5):445–457
  29. Veis A, Tompkins K, Alvares K, Wei K, Wang L, Wang XS, Brownell AG, Jengh SM, Healy KE: Specific amelogenin gene splice products have signaling effects on cells in culture and in implants in vivo. *J Biol Chem* 2000, 275:41263–41272
  30. Warotayanont R, Zhu D, Snead ML, Zhou Y: Leucine-rich amelogenin peptide induces osteogenesis in mouse embryonic stem cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2008, 367:1–6
  31. Hatakeyama J, Sreenath T, Hatakeyama Y, Thyagarajan T, Shum L, Gibson CW, Wright JT, Kulkarni AB: The receptor activator of nuclear factor-kappa B ligand-mediated osteoclastogenic pathway is elevated in amelogenin-null mice. *J Biol Chem* 2003, 278:35743–35748
  32. Hatakeyama J, Philip D, Hatakeyama Y, Haruyama N, Shum L, Aragon MA, Yuan Z, Gibson CW, Sreenath T, Kleinman HK, Kulkarni AB: Amelogenin-mediated regulation of osteoclastogenesis, and periodontal cell proliferation and migration. *J Dent Res* 2006, 85:144–149
  33. Zhou YL, Snead ML: Identification of CCAAT/enhancer-binding protein alpha as a transactivator of the mouse amelogenin gene. *J Biol Chem* 2000, 275:12273–12280
  34. Bonass WA, Robinson PA, Kirkham J, Shore RC, Robinson C: Molecular cloning and DNA sequence of rat amelogenin and a comparative analysis of mammalian amelogenin protein sequence divergence. *Biochem Biophys Res Commun* 1994, 198:755–763
  35. Hotton D, Davideau JL, Bernaudin JF, Bernald A: In situ hybridization of calbindin-D 28 k transcripts in undecalcified sections of the rat continuously erupting incisor. *Connect Tissue Res* 1995, 32:137–143
  36. Lezot F, Thomas B, Greene SR, Hotton D, Yuan ZA, Castaneda B, Bolanos A, Depew M, Sharpe P, Gibson CW, Bernald A: Physiological implications of DLX homeoproteins in enamel formation. *J Cell Physiol* 2008, 216:688–697
  37. Ghoul-Mazgar S, Hotton D, Lezot F, Blin-Wakkach C, Asselin A, Sautier JM, Bernald A: Expression pattern of Dlx3 during cell differentiation in mineralized tissues. *Bone* 2005, 37:799–809
  38. Zhou YL, Lei Y, Snead ML: Functional antagonism between Msx2 and CCAAT/enhancer-binding protein alpha in regulating the mouse amelogenin gene expression is mediated by protein-protein interaction. *J Biol Chem* 2000, 275:29066–29075
  39. Papagerakis P, Hotton D, Lezot F, Brookes S, Bonass W, Robinson C, Forest N, Bernald A: Evidence for regulation of amelogenin gene expression by 1,25-dihydroxyvitamin D(3) in vivo. *J Cell Biochem* 1999, 76:194–205
  40. Snead ML, Luo W, Lau EC, Slavkin HC: Spatial- and temporal-restricted pattern for amelogenin gene expression during mouse molar tooth organogenesis. *Development* 1988, 104:77–85
  41. Janones DS, Massa LF, Arana-Chavez VE: Immunocytochemical examination of the presence of amelogenin during the root development of rat molars. *Arch Oral Biol* 2005, 50:527–532
  42. Fong CD, Hammarstrom L: Expression of amelogenin and amelogenin in epithelial root sheath remnants of fully formed rat molars. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2000, 90:218–223
  43. Lezot F, Descroix V, Mesbah M, Hotton D, Blin C, Papagerakis P, Mauro N, Kato S, MacDougall M, Sharpe P, Bernald A: Cross-talk between Msx/Dlx homeobox genes and vitamin D during tooth mineralization. *Connect Tissue Res* 2002, 43:509–514
  44. Wurtz T, Bernald A: Osteoblast precursors at different anatomic sites. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 2003, 13:147–161
  45. Witkop CJ, Jr.: Amelogenesis imperfecta, dentinogenesis imperfecta and dentin dysplasia revisited: problems in classification. *J Oral Pathol* 1988, 17:547–553
  46. Kim JW, Seymen F, Lin BP, Kiziltan B, Gencay K, Simmer JP, Hu JC: ENAM mutations in autosomal-dominant amelogenesis imperfecta. *J Dent Res* 2005, 84:278–282
  47. Wright JT, Daly B, Simmons D, Hong S, Hart SP, Hart TC, Atsawasuwan P, Yamauchi M: Human enamel phenotype associated with amelogenesis imperfecta and a kallikrein-4 (g. 2142G>A) proteinase mutation. *Eur J Oral Sci* 2006, 114(Suppl 1):13–17, discussion 39–41, 379
  48. Ozdemir D, Hart PS, Ryu OH, Choi SJ, Ozdemir-Karatas M, Firatli E, Plesco N, Hart TC: MMP20 active-site mutation in hypomaturation amelogenesis imperfecta. *J Dent Res* 2005, 84:1031–1035
  49. Paine ML, Wang HJ, Luo W, Krebsbach PH, Snead ML: A transgenic animal model resembling amelogenesis imperfecta related to ameloblastin overexpression. *J Biol Chem* 2003, 278:19447–19452
  50. Paine ML, Zhu DH, Luo W, Bringas P, Jr., Goldberg M, White SN, Lei YP, Sarikaya M, Fong HK, Snead ML: Enamel biomineralization defects result from alterations to amelogenin self-assembly. *J Struct Biol* 2000, 132:191–200
  51. Gibson CW, Yuan ZA, Li Y, Daly B, Suggs C, Aragon MA, Alawi F, Kulkarni AB, Wright JT: Transgenic mice that express normal and mutated amelogenins. *J Dent Res* 2007, 86:331–335
  52. Fukumoto S, Yamada A, Nonaka K, Yamada Y: Essential roles of ameloblastin in maintaining ameloblast differentiation and enamel formation. *Cells Tissues Organs* 2005, 181:189–195
  53. Seedorf H, Klatten M, Eke F, Fuchs H, Seedorf U, Hrabec de Angelis M: A mutation in the enamelin gene in a mouse model. *J Dent Res* 2007, 86:764–768
  54. Yoshida K, Yoshida N, Aberdam D, Meneguzzi G, Perrin-Schmitt F, Stoetzel C, Ruch JV, Lesot H: Expression and localization of laminin-5 subunits during mouse tooth development. *Dev Dyn* 1998, 211:164–176
  55. Ravindranath RM, Basilrose RM, Sr., Ravindranath NH, Vaitheesvaran B: Amelogenin interacts with cytokeratin-5 in ameloblasts during enamel growth. *J Biol Chem* 2003, 278:20293–20302
  56. Boabaid F, Gibson CW, Kuehl MA, Berry JE, Snead ML, Nociti FH, Jr., Katchburian E, Somerman MJ: Leucine-rich amelogenin peptide: a candidate signaling molecule during cementogenesis. *J Periodontol* 2004, 75:1126–1136
  57. Swanson EC, Fong HK, Foster BL, Paine ML, Gibson CW, Snead ML, Somerman MJ: Amelogenins regulate expression of genes associated with cementoblasts in vitro. *Eur J Oral Sci* 2006, 114(Suppl 1):239–243; discussion 254–256, 381–382

58. Zeichner-David M, Chen LS, Hsu Z, Reyna J, Caton J, Bringas P: Amelogenin and ameloblastin show growth-factor like activity in periodontal ligament cells. *Eur J Oral Sci* 2006, 114 Suppl 1:244–253; discussion 254–256, 381–382
59. Viswanathan HL, Berry JE, Foster BL, Gibson CW, Li Y, Kulkarni AB, Snead ML, Somerman MJ: Amelogenin: a potential regulator of cementum-associated genes. *J Periodontol* 2003, 74:1423–1431
60. Nishiguchi M, Yuasa K, Saito K, Fukumoto E, Yamada A, Hasegawa T, Yoshizaki K, Kamasaki Y, Nonaka K, Fujiwara T, Fukumoto S: Amelogenin is a negative regulator of osteoclastogenesis via down-regulation of RANKL, M-CSF and fibronectin expression in osteoblasts. *Arch Oral Biol* 2007, 52:237–243
61. Mizuno N, Shiba H, Mouri Y, Xu W, Kudoh S, Kawaguchi H, Kurihara H: Characterization of epithelial cells derived from periodontal ligament by gene expression patterns of bone-related and enamel proteins. *Cell Biol Int* 2005, 29:111–117
62. Hamamoto Y, Nakajima T, Ozawa H, Uchida T: Production of amelogenin by enamel epithelium of Hertwig's root sheath. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 1996, 81:703–709



## **V.B. LES PROTEINES AMELAIRES DANS LE TISSU OSSEUX**

Cette deuxième partie présente des résultats non publiés. Elle correspond à une remise en question profonde des méthodes d'analyse *in situ* qui nous conduit à penser et à repenser les schémas fondateurs de la tissu-spécificité, remise en question par une première émergence des protéines de l'émail dans les autres tissus dentaires (Veiss, 2000, article 3) et actuellement bouleversée par des données sortant en masse dans la littérature ces dernières années et mois.

Les techniques d'analyse des ARN ont beaucoup évolué, depuis le Northern blotting avec l'arrivée de la RT PCR puis de la PCR quantitative en temps réel (RT QPCR), l'émergence des ARN non codants et les microARNs et des approches globales de la transcriptomique.

Ceci apporte une diminution importante du seuil de sensibilité de détection des ARNm et des données mesurables.

Un décalage intervient alors, entre cette haute sensibilité de la QPCR en temps réel et leur nature quantitative et les techniques classiques de visualisation *in situ* des ARN et des protéines qui ont moins rapidement évolué.

Des nouvelles interrogations méthodologiques apparaissent :

### **1°) Existe t-il un décalage entre la RT-QPCR et les techniques de visualisation des ARN sur coupes ?**

Manifestement, la réponse est affirmative quand on analyse les taux d'expression de protéines de l'émail décelées par RT QPCR sur les tissus osseux dentaires et extradentaires (os basal, os alvéolaire de la mandibule et tibia) qui montrent une expression difficilement mise en évidence *in situ* dans ces tissus comme cela sera précisé dans nos résultats.

### **2°) Le fait que les amélogénines soient visualisées dans les cellules des restes de Malassez des animaux *Msx2* mutant nul (article 4) illustre t-il que le seuil de détection des techniques classiquement utilisées depuis 20 ans est inopérant ?**

En effet, les amélogénines sont indétectables par hybridation *in situ* dans les débris épithéliaux de Malassez après décalcification chez les souris sauvages adultes de 3 mois.

Cette remarque valide notre stratégie expérimentale décrite dans les deux premiers articles où nous travaillions sur des tissus de 15 jours à 56 jours sans les décalcifier. La décalcification est un processus drastique qui extrait dans son action les ARN et les protéines (Molla et coll., 2010).

### **3°) Tous les résultats publiés depuis des décennies seraient ils entachés d'un a priori sur la tissu-spécificité de nos prélèvements ?**

Les données non publiées du laboratoire posent la question de savoir si l'expression des gènes qui codent pour des protéines de l'émail dans le tissu osseux pourrait être la conséquence d'une contamination par d'autres tissus au cours de la microdissection.

### **4°) Et les négatifs décrits seraient ils de faux négatifs ?**

Pendant très longtemps, les protéines de la matrice amélaire, particulièrement l'amélogénine, ont été décrites comme des protéines exclusivement présentes au niveau de l'émail. Les études histologiques initiales montraient une expression exclusivement améloblastique, qui débute dans les pré-améloblastes et devient maximale au niveau des améloblastes de sécrétion (Pour revue, Hu et coll., 2001a). La détection des amélogénines au niveau de sites de la dent autres que l'émail, tels que la matrice dentinaire avait été d'abord interprétée comme le résultat de la migration de peptides de bas poids moléculaire en provenance du tissu amélaire.

De ce fait, depuis 20 ans, en immunohistochimie des protéines de la matrice amélaire, nous utilisons des dilutions d'anticorps primaire élevées et éliminons systématiquement, en les considérant comme de faux positifs ou comme du bruit de fond, les coupes avec un marquage des cellules dentaires et osseuses (odontoblastes, ostéoblastes et ostéocytes).

Plusieurs auteurs ont localisé les amélogénines dans les odontoblastes (Veis et coll., 2000 ; 2003 ; article 3). Haze et coll. en 2007 ont montré l'expression des amélogénines dans les cellules osseuses et cartilagineuses.

Les réponses à ces multiples interrogations passent par une refonte complète des protocoles d'immunocytochimie et d'hybridation in situ en prenant la quantification sur broyat (Western blotting et QPCR) comme base de la présence ou l'absence de l'expression d'une protéine et d'un gène, et de leur niveau relatif d'expression (*Figures 34, 35 et 36* ; Thèse de Muriel De la Dure-Molla, 2008). Il nous faut revoir toutes nos bases après 20 années de stabilité et de sentiment de sérieux et de précision.

#### **V.B.1. Mises au point et évaluations des techniques alternatives pour l'étude *in situ* des tissus minéralisés**

La souris représente désormais le modèle de choix pour l'étude du développement sur le plan embryonnaire et génétique. Après le rat, la souris est devenue le support du travail car elle nous permet d'observer les différentes phases du développement dentaire, mandibulaire et du développement du squelette vertébral et appendiculaire. Nous avons donc mis au point une approche originale pour l'étude des protéines matricielles de l'émail au niveau des tissus minéralisés.

Nous avons miniaturisé notre technique de microdissection sous loupe pour prélever l'épithélium et le mésenchyme dentaire de la souris. Nous avons disséqué d'autres types de prélèvement (osseux mandibulaire et osseux appendiculaire).

#### **V.B.1.a. Adaptation à la grande précision de la PCR en temps réel comparativement aux Northern-blots et à la PCR qualitative**

Les techniques de microdissection et d'expérimentation mises au point dans notre laboratoire nous autorisent donc une exploration des effecteurs moléculaires d'un point de vue qualitatif et quantitatif en PCR. Cette cartographie envisage les différents contingents dentaires, osseux mandibulaires et osseux appendiculaires, adultes et néonataux.

Les travaux *in vivo* ont été effectués sur la mandibule de souris Swiss, mâles, sauvages, des premières semaines (14 jours) du développement aux stades du jeune adulte (souris 105 jours).

Ces tissus, qui trouvent leur origine au niveau ectodermique (épithélium) et des cellules dérivées de la crête neurale (os basal et alvéolaire de la mandibule) ont été comparés au tibia, qui est la référence mésodermique.

Nous avons étudié le début du programme ostéo-odontogène chez la souris de 14 jours et la période d'homéostasie existante chez la souris jeune adulte de 105 jours.

Les niveaux relatifs d'ARNm codant pour l'Amélogénine, l'Améloblastine et l'Enaméline ont été mesurés dans les tissus minéralisés et non minéralisés des souris à l'âge de 105 jours.

Les niveaux d'expression dans les cellules dentaires épithéliales ont été pris comme référence.

Le tibia a été choisi comme référence du squelette appendiculaire mésodermique.

##### **V.B.1.a.1. Protocole des méthodes quantitatives sur broyats de tissus : LA RT-PCR en temps réel**

Afin d'aborder par une approche quantitative, notre étude de l'expression de l'Amélogénine, de l'Améloblastine et de l'Enaméline, des souris sont sacrifiées, les mandibules, les tibias et une sélection de tissus non minéralisés sont disséqués.

L'analyse de l'expression des ARN codant pour les protéines amélares est menée dans les tissus mandibulaires et osseux. Dans la mandibule, quatre zones d'intérêt ont été prélevées sous microscope stéréoscopique : l'os basal, l'os alvéolaire, l'épithélium et le mésenchyme dentaires (*voir Figure 28*).

L'os basal est isolé en premier au niveau de la partie postérieure de la mandibule, puis ensuite l'os alvéolaire est prélevé entre la portion molaire et incisive. Puis l'incisive est extraite de la mandibule et les cellules épithéliales sont prélevées sur sa surface inférieure. Les cellules mésenchymateuses pulpaire sont prélevées après fracture de l'incisive. Chaque échantillon est placé immédiatement dans le Tri-Reagent (Euromedex, France) pour extraire les ARN.

La dissection des tibias commence par l'élimination des tissus mous environnants et du cartilage articulaire. Le tibia est ensuite broyé dans l'azote liquide.

La dissection des tissus non minéralisés (intestin, colon, foie, cerveau, poumon, cœur, langue, muscle, rein, peau, estomac, ovaires, testicule, rate, bulbe rachidien et œil) est réalisée sur des souris mâles et femelles de 105 jours. Tous les tissus sont broyés dans l'azote liquide, puis sont traités dans le Tri-Reagent pour l'extraction des ARN (1 ml pour 50 à 100 mg de tissu).

#### \*Protocole d'extraction des ARN messagers

On ajoute 200 µl de chloroforme par échantillon. Après 15 minutes d'incubation, ceux-ci sont centrifugés à 12500 rpm pendant 30 minutes. La phase aqueuse contenant les ARN est récupérée. Dans une deuxième étape, les ARN sont précipités par l'ajout de 500 µl d'isopropanol.

Le culot, formé après une centrifugation de 30 minutes à 12500 rpm, est lavé de ses sels par l'éthanol 70% dans une troisième étape. Le culot sera repris dans de l'eau RNase-free (25 µl d'eau pour l'épithélium et 50 µl pour l'os, le mésenchyme, le tibia et les tissus mous).

*Dosage des ARN totaux par mesure de l'absorbance* : Le dosage est effectué au Nanodrop (réf) en prenant l'eau stérile comme référence. Une unité de densité optique à 260 nm correspond à 40µg/ml d'ARN :  $[\text{ARN}](\mu\text{g/ml}) = \text{DO}_{260} \times 40$ .

La qualité des ARN est calculée grâce au rapport  $\text{DO}_{260}/\text{DO}_{280}$  (rapport des absorbances à 260 nm/280 nm) qui doit avoir une valeur de 1,8 considérée comme une valeur de qualité des ARN.

La présence des ARN ribosomiaux 28S et 18S sur gel d'agarose est notre référence pour confirmer la bonne qualité des ARN.

#### \*Transcription inverse des ARN

Les ARN totaux (de 200 ng/µl à 1 µg/µl selon la série d'expérimentation) sont rétro transcrits en ADNc (Kit Invitrogen, France). Les ARN sont ajoutés à un mélange d'amorces oligodT et hexanucleotidiques (Random Primers), v/v et de nucléotides. Les échantillons sont chauffés à 65°C pendant 5 minutes, puis replacés rapidement dans la glace afin d'éviter la reformation des structures secondaires. Un mélange contenant l'enzyme transcriptase inverse (superscript II), sa solution tampon, du DTT et un inhibiteur des RNase (RNase out) est ajouté aux échantillons et incubé 50 minutes à 42°C. La réaction est arrêtée par inactivation de l'enzyme en chauffant à 70°C pendant 15 minutes. L'ADNc obtenu est conservé à -80°C.

#### \*Polymérase Chain Réaction (PCR) en temps réel

La technique est basée sur le principe d'amplification artificielle de l'ADN où le nombre de copies d'une séquence spécifique d'un gène (amplicons) est doublé à chaque cycle grâce à l'action d'une ADN polymérase thermostable appelée Taq Polymérase. Comme pour la PCR classique, chaque cycle de la PCR en temps réel est

composé de trois étapes thermodépendantes : la dénaturation ou la séparation des brins de l'ADN cible, l'hybridation des amorces sur les brins d'ADN et l'extension des amorces ou replication.

La quantification relative est possible grâce à la détection d'un marqueur fluorescent. Nous avons utilisé ici le Sybergreen (Quanta/nir), agent intercalant spécifique de l'ADN double brin. L'amplification du gène est mesurée en temps réel pour une lecture de la fluorescence à chaque fin du cycle par l'appareil PCR (Mini Opticon, Biorad, France).

Nous avons choisi des amorces spécifiques aux gènes de l'amélogénine, l'améloblastine, l'énaméline pour effectuer cette analyse semi-quantitative (Tableau 4). Le choix des amorces à partir des séquences de nos gènes d'intérêt a été établi sur le site [www.ncbi.gov](http://www.ncbi.gov), et effectué selon trois critères : 1°) Les amorces spécifiques sont choisies sur des exons différents, afin de pouvoir éviter une contamination de nos échantillons avec de l'ADN génomique. 2°) Elles ont une composition proche de 50% en bases G et C avec une taille d'environ 20 paires de bases, et par conséquent une température d'hybridation proche à 60°C. 3°) Elles ne doivent avoir qu'une faible homologie avec d'autres gènes pour éviter une amplification non spécifique.

Gene	Primer	Séquence	Longueur	t°	[P]µM	Mix Sybr	Cycles
Amelogenine	P20	AAGCATCCCTGAGCTTCAGA	371pb (20s)	60	0.45	7.5	40
	P21	CAGCAACCAATGATGCCAGT					
Ameloblastine	P3	AGCTGATAGCACCAGATGAG	287pb (20s)	60	0.45	7.5	40
	P4	TGGCCTATGGAACCTCTGTTT					
Enameline	P3	TCCTTGTTTTCTGGGTCTG	246pb (20s)	60	0.45	7.5	40
	P4	TCCACCAGTACCCAATGGAT					
RS15	P1	GGCTTGAGGTGATGGAGAA	336 pb (20s)	60	0.45	7.5	40
	P2	CTCCGCAAGTTCACCTACC					
GAPDH	P1	GACCCCTTCATTGACCTCAACTAC	350 pb (20s)	60	0.45	7.5	40
	P2	AAGTTGTCATGGATGACCTTGGCC					

**Tableau 4. Primers utilisés**

Ces critères permettent de suivre l'augmentation de la quantité des amplicons produits en un point précis de la réaction. Ainsi, plus la quantité d'ADN recherché au départ de la réaction (matrices/templates) est grande moins le nombre de cycles requis pour atteindre le point où le signal d'émission de fluorescence sera statistiquement et significativement plus élevé que le bruit de fond (Cycle seuil=Ct/ threshold cycle) sera élevé. Ce système permet donc une quantification relative rapportée à une gamme de 5 points à laquelle on attribue des valeurs arbitraires. Après l'établissement de cet étalonnage en utilisant un tissu référence, contenant le ou les ADNc à étudier (AMEL, AMB, ENAM), nous obtenons des valeurs arbitraires qui permettent de comparer l'expression entre les différents échantillons. Les PCR sont normalisées par la mesure d'expression de gènes dits « de référence » (RS15 et GAPDH), gènes dont l'expression est considérée comme stable quelque soit le tissu, l'âge et l'animal.

Les solutions utilisées dans les plaques/puits pour la qPCR selon le système Biorad sont les suivantes :

Tampon :- Mix Bio-rad : MgCl<sub>2</sub>, dNTPs, Taq polymérase et tampon d'enzyme : 7,5 µl/tube

- Amorces P1/P2 (10 µM) : 0.45 µl/tube.

- H<sub>2</sub>O : 1,6 µl/tube.

Total: 10 µl/puits

Le tampon est ajouté : 5 µl/puits par échantillon à analyser

- Nous avons soit, une gamme de dilution à cinq points (étalonnage) :

De 1/50 à 1/800, pour l'étude des protéines amélaire au niveau des tissus mandibulaires et du tibia et de 1/25 à 1/400.

- Soit, les échantillons dilués :

Dilution de 1/100, pour l'étude des protéines amélaire au niveau des tissus mandibulaires et du tibia.

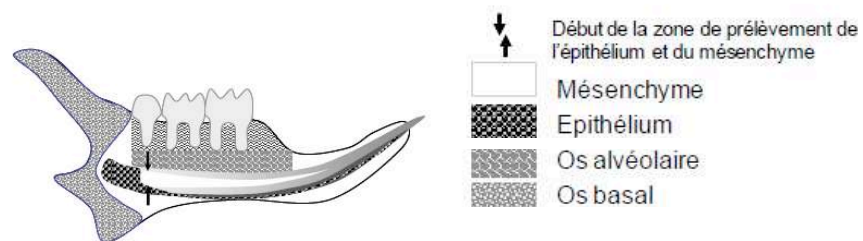
Dilution des échantillons de 1/50, pour la recherche des témoins négatifs au niveau des tissus mous.

- Ou bien, le contrôle négatif : H<sub>2</sub>O

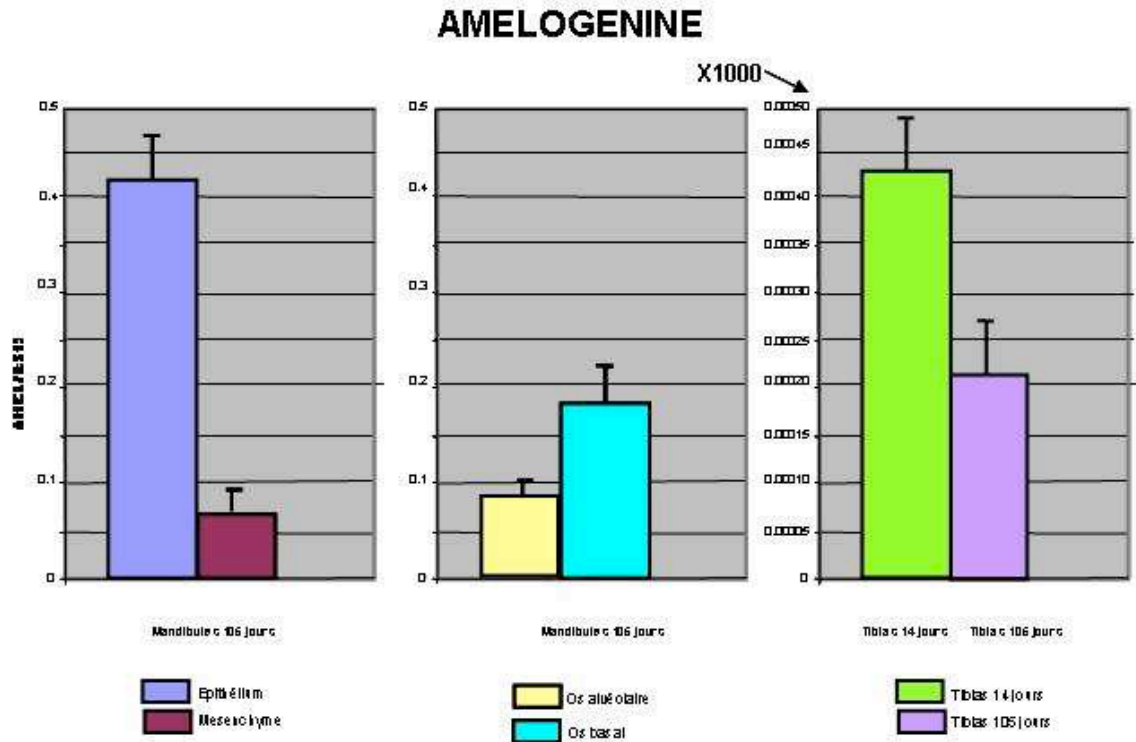
Le total nécessaire dans chaque puits pour la réaction est de 15 µl/puits. La température et la durée de ces étapes peuvent varier afin de mieux caractériser un gène. Les cycles sont renouvelés entre 40 à 50 fois suivant la quantité de cible de départ et le but poursuivi.

Nous avons procédé ensuite au traitement informatique des résultats.

#### **V.B.1-a.2. Expression de l'amélogénine, de l'améloblastine et de l'énaméline**

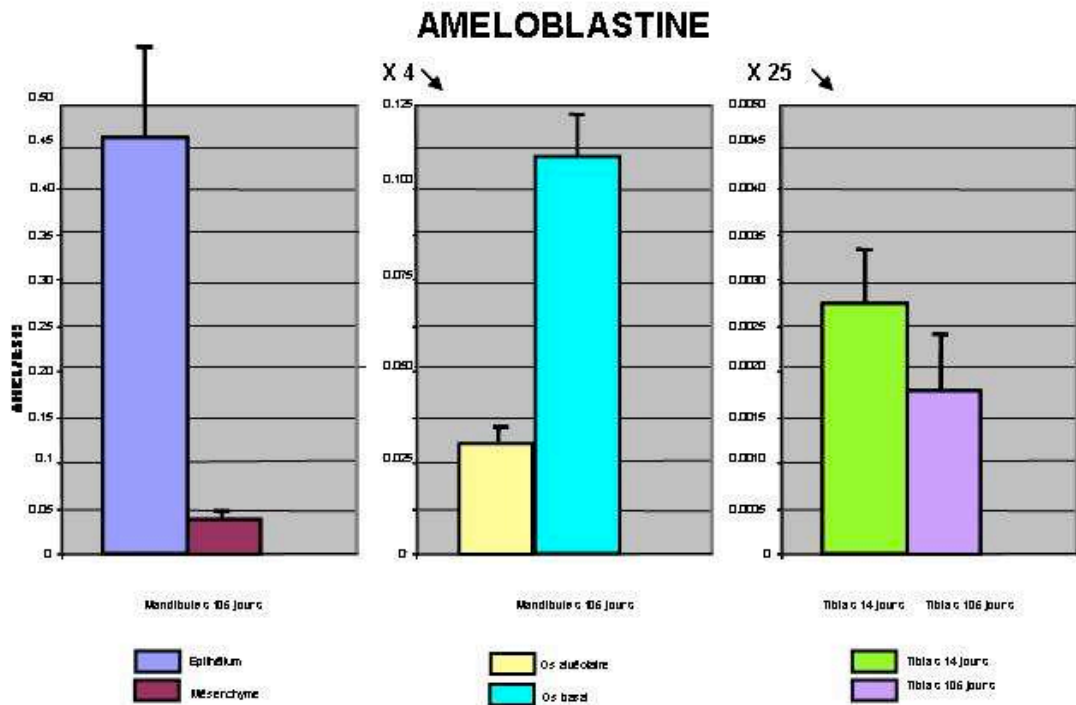


**Figure 28.** Schéma des différentes zones de la microdissection des mandibules de souris

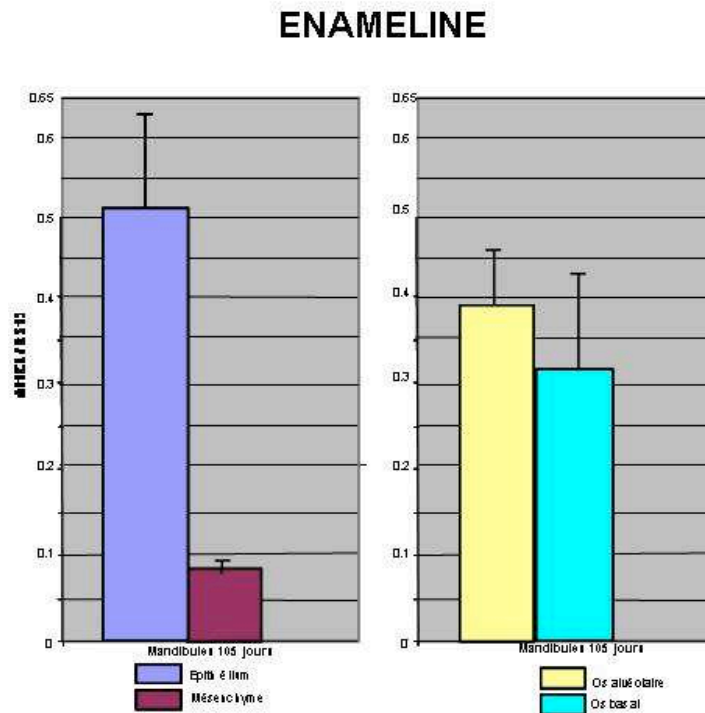


**Figure 29.** Expression des transcrits de l'amélogénine. RT-QCPR sur mandibules microdisséquées (105 jours) et sur tibias de 14 jours et 105 jours. (\* $P < 0,05$  test de Mann-Witney). Les échelles du schéma représentant les taux d'expression des transcrits de l'amélogénine dans l'épithélium, le mésenchyme et du schéma dans l'os alvéolaire et l'os basal dans les mandibules de 105 jours sont les mêmes.

L'échelle du schéma représentant les taux des transcrits de l'amélogénine dans les tibias de 14 jours et 105 jours est divisée par 1000 par rapport aux échelles des schémas épithélium/mésenchyme et os basal/os alvéolaire.



**Figure 30.** Expression des transcrits de l'améloblastine. RT-QCPR sur mandibules microdisséquées de 105 jours et sur tibias de 14 jours et 105 jours (\* $P < 0,05$  test de Mann- Witney). L'échelle du schéma représentant les taux d'expression des transcrits de l'amélogénine dans l'épithélium et le mésenchyme est multipliée par 4 par rapport à l'échelle du schéma de l'os alvéolaire et de l'os basal dans les mandibules de 105 jours et par 100 par rapport à l'échelle du schéma représentant les taux de transcrits dans les tibias de 14 jours et de 105 jours.



**Figure 31.** Expression des transcrits de l'énaméline. RT-QCPR sur mandibules microdisséquées de 105 jours (\* $P < 0,05$  test de Mann- Witney). Les échelles des schémas sont identiques. L'Enaméline n'est pas détectable dans les tibias à 14 jours et à 105 jours.



### **V.B.1.a.3. Profils d'expression des transcrits des trois protéines amélares dans les tissus osseux de la mandibule et du tibia**

Dans la mandibule, les ARNm des trois gènes des protéines amélares sont exprimés. On observe un gradient d'expression décroissant os basal > os alvéolaire, c'est-à-dire en relation inverse avec la proximité de la dent.

Le rapport d'expression entre os mandibulaire et épithélium dentaire est de 1/10 à 1/25 pour l'os alvéolaire et l'os basal. L'énaméline présente un taux d'expression très proche entre tissus dentaires et osseux (1/3). Le rapport d'expression entre l'os du tibia et l'épithélium dentaire est de plus de 1/1000 pour l'amélogénine et l'améloblastine. On observe que l'os du tibia (14 jours et 105 jours) exprime l'amélogénine et l'améloblastine.

L'énaméline n'est pas détectable. Dans ces résultats, il est surprenant d'observer que le ratio d'expression du gène de l'énaméline soit si peu différent entre l'os et la dent au niveau de la mandibule. Cette donnée pour l'énaméline est en contradiction avec le dogme majoritaire.

Le fait le plus marquant est l'importante différence entre les taux d'expression dans les os mandibulaires et l'os appendiculaire représenté ici par le tibia.

L'hypothèse d'une contamination par les ARN issus de la dent lors de la microdissection de l'os pourrait être envisagée mais notre méthode de dissection des mandibules est extrêmement précise. Elle approche les cellules dentaires en dernière intention après avoir procédé au retrait du bloc molaire et le segment d'os alvéolaire pour accéder à la logette de l'incisive. Le segment d'os basal correspond à la partie postérieure incluant la branche montante, le condyle et le coroné. Nous accédons ainsi à la dernière portion d'os alvéolaire de laquelle est extraite l'incisive qui est alors microdisséquée dans ses portions épithéliale et mésenchymateuse en prenant soin de couper la loupe apicale à 1-2 mm du début de minéralisation.

Si les extraits cellulaires étaient contaminés, la contamination serait similaire pour tous les ARN étudiés et montrerait alors des résultats proportionnels entre dent et os mandibulaires pour tous les ARN. Or, des travaux comparant les différents compartiments dans le contexte génétique des souris sauvages et mutées pour *Msx2* (hétérozygotes et homozygotes) montrent des variations différentes pour chacun de ces gènes.

Ces spécificités des ratios de base et de la régulation des taux d'ARN par *Msx2* apportent la démonstration pour un même tissu osseux de l'existence d'une complexité régionale de régulation de l'expression du phénotype ostéoblastique et montrent des différences significatives et spécifiques de chaque gène, de chaque site et de chaque stade.

#### **\*Recherche de tissus négatifs pour les protéines de la matrice amélaire**

L'analyse de l'expression des ARNs codant pour les trois protéines de la matrice amélaire au niveau de différents tissus mous a révélé l'absence de ces protéines au niveau du colon et du muscle pour l'amélogénine et de l'intestin, le foie et le muscle pour l'améloblastine et l'énaméline. Le muscle a été choisi comme contrôle négatif dans nos études *in situ* (travaux de thèse de Jaime JACQUES).

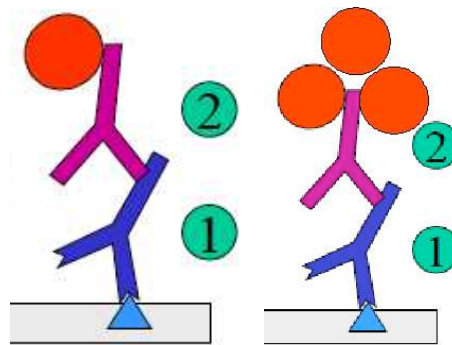
### **V.B.1.b. Adaptation des techniques d'immunohistochimie à la grande précision de la PCR en temps réel**

#### **V.B.2.b.1. Mise au point et évaluation de la technique d'immunohistochimie**

Une évaluation et une adaptation des études in situ par immunohistochimie a été nécessaire pour visualiser les quantités de protéine correspondant à celles des ARN détectés par RT-QPCR dans les tissus osseux.

Nous avons pris les quantités d'ARN révélés en RT QPCR dans les compartiments osseux et dentaires comme guide pour la suite de nos investigations avec comme base mesurable des ratios intertissulaires.

L'immunohistochimie est une méthode basée sur l'utilisation d'un anticorps pour situer une protéine dans un tissu ou dans des cellules. Le tissu fixé, lavé et perméabilisé, est ensuite incubé avec un anticorps primaire qui reconnaît spécifiquement la protéine d'intérêt. On révèle cette protéine avec un second anticorps dirigé contre la classe d'immunoglobuline à laquelle appartient l'anticorps primaire. Le second anticorps qui va reconnaître la partie constante Fc de l'anticorps primaire, doit avoir été synthétisé chez une autre espèce que celle où a été synthétisé l'anticorps primaire. L'anticorps secondaire est couplé à un marqueur, soit fluorescent (FITC, Alexa ou Quantum dot), soit enzymatique (peroxydase ou phosphatase alcaline) qui sera exploitée pour obtenir une réaction colorimétrique. Pour augmenter la sensibilité de révélation de la réaction antigène/anticorps, nous avons utilisé un anticorps secondaire couplé à plusieurs molécules d'enzyme (Kit Impress, Abscys, France) (Figure 32).



**Figure 32. Immunomarquage. 1 : anticorps primaire ; 2 : anticorps secondaire (Garaud et Roussel, Strasbourg, 2007)**

Classiquement, la dilution de l'anticorps primaire utilisé pour l'immunomarquage des protéines amélaire au niveau des améloblastes est élevée.

#### **V.B.1.b.2. Protocole d'immunohistochimie**

La dilution de l'anticorps primaire utilisé dans les publications des 20 dernières années pour l'immunomarquage des protéines amélaire (amélogénine AMEL, améloblastine, AMB et énameline, ENAM) l'existence au niveau des améloblastes était élevée. L'évaluation des conditions d'immunodetection était basée

sur le concept exclusif d'un marquage dans les améloblastes voir ensuite dans les odontoblastes. Pour préciser l'expression des protéines amélaire à l'échelle protéique dans le tissu osseux mandibulaire et le tibia en fonction des quantités d'ARNm révélées en PCR en temps réel, nous avons réalisé des immunomarquages à des concentrations croissantes, jusqu'alors inutilisées dans notre équipe, de l'anticorps dirigé contre chaque protéine (AMEL, AMB et ENAM) (Tableau 5) chez les souris à 7 jours et à 105 jours. Le choix du muscle comme le tissu témoin négatif a été faite suite a l'absence en RT-QPCR d'ARN codant pour ces protéines amélaire dans ce tissu.

Anticorps Primaire	Type	Origine	Dilutions Ac primaire	Fournisseur
Anti-Amélogénine	Polyclonal	Lapin	1, x2, x10, x20, x100	Sasaki T, Japon
Anti-Ameloblastine	Polyclonal	Lapin	1, x2, x10, x20, x100	Wurtz T, France
Anti-Enameline	Polyclonal	Lapin	1, x2, x10, x20, x100	Simmer J, Etats Unis

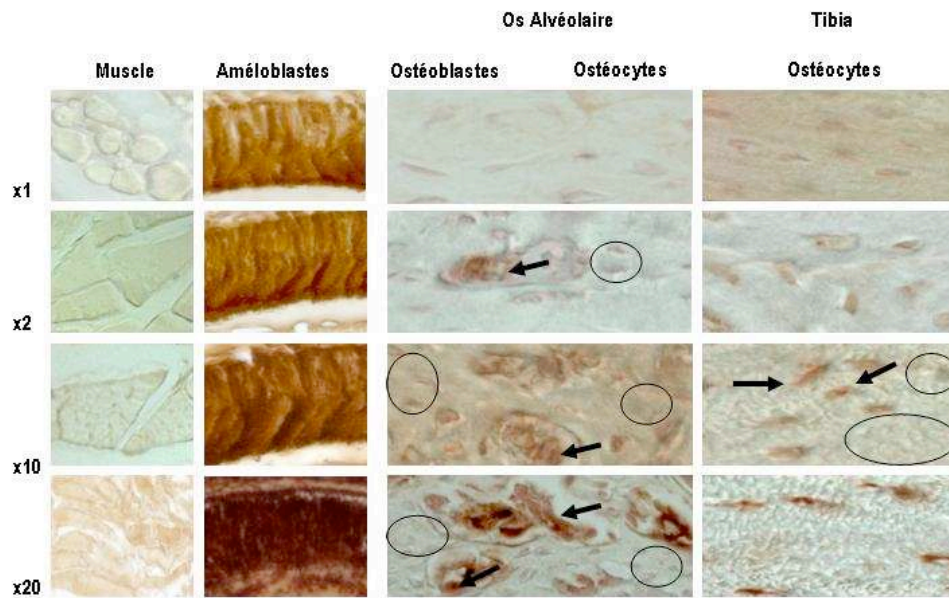
**Tableau 5. Les anticorps dirigés contre les protéines amélaire**

Les peroxydases endogènes ont été inactivées par un traitement dans du peroxyde d'hydrogène à 3% pendant 30 minutes à température ambiante. Les sites de liaison du tissu ont été saturés avec du sérum non immun de l'animal hôte de l'anticorps secondaire à 10% dans lequel nous avons rajouté 1% d'albumine bovine (BSA) et 0,1% de Tween durant 16 heures à 4°C. Nous avons ensuite utilisé des dilutions des anticorps primaires (AMEL, AMB et ENAM) de concentrations décroissantes pour l'étude de ces protéines de l'émail au niveau osseux.

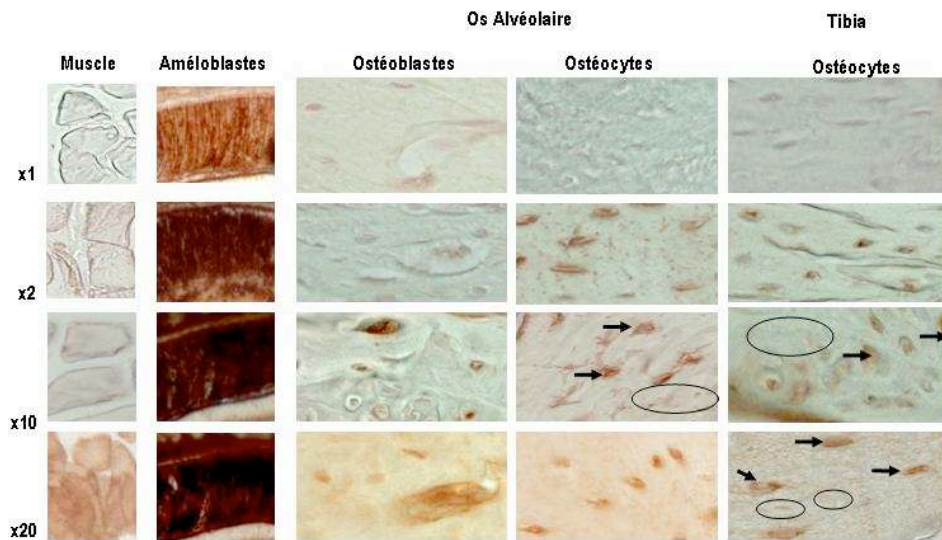
Les coupes ont été ensuite incubées durant 1 heure à température ambiante dans un tampon PBS1x BSA1% et 2.5% de sérum non immun de l'animal hôte de l'anticorps secondaire (chèvre).

Après 3 rinçages au PBS 1X, l'anticorps secondaire dilué au 1/200 (Kit AbCyss, France) a été incubé durant 30 minutes à température ambiante. La 3-3'diaminobenzidine a été utilisée comme substrat de la peroxydase (Novared, AbCyss, France) selon les instructions du fournisseur pour visualiser nos résultats après 15 minutes d'incubation à température ambiante. Les coupes ont été ensuite déshydratées et montées entre lame et lamelle avec de l'Eukitt (Labonord, France). Les observations et les photographies ont été réalisées à l'aide d'un microscope photonique DMRB couplé à une caméra digitale DF300 (Leica, France).

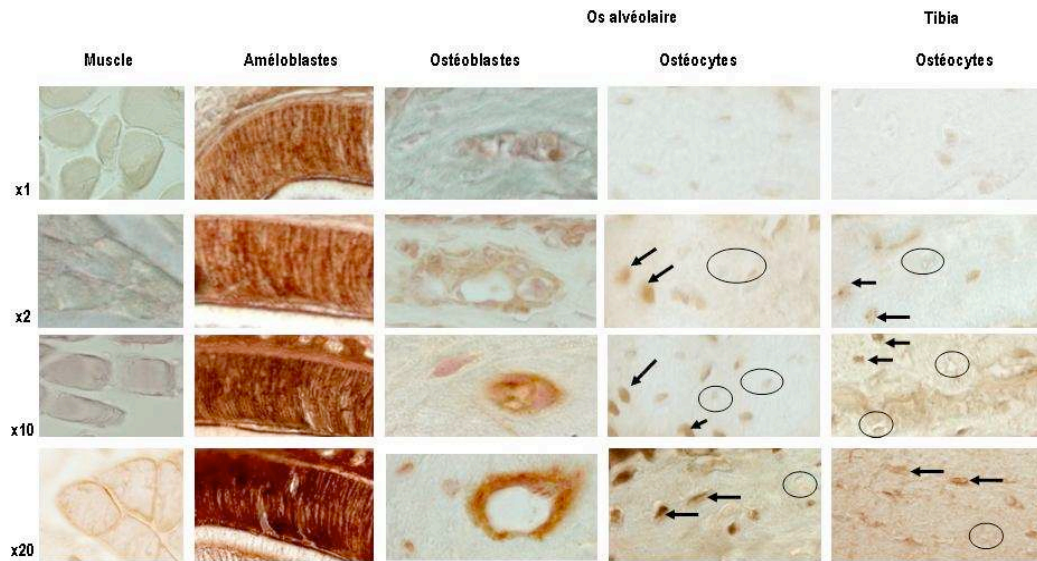
**V.B.1.b.3. Expression des trois protéines amélares dans les tissus osseux de la mandibule et du tibia**



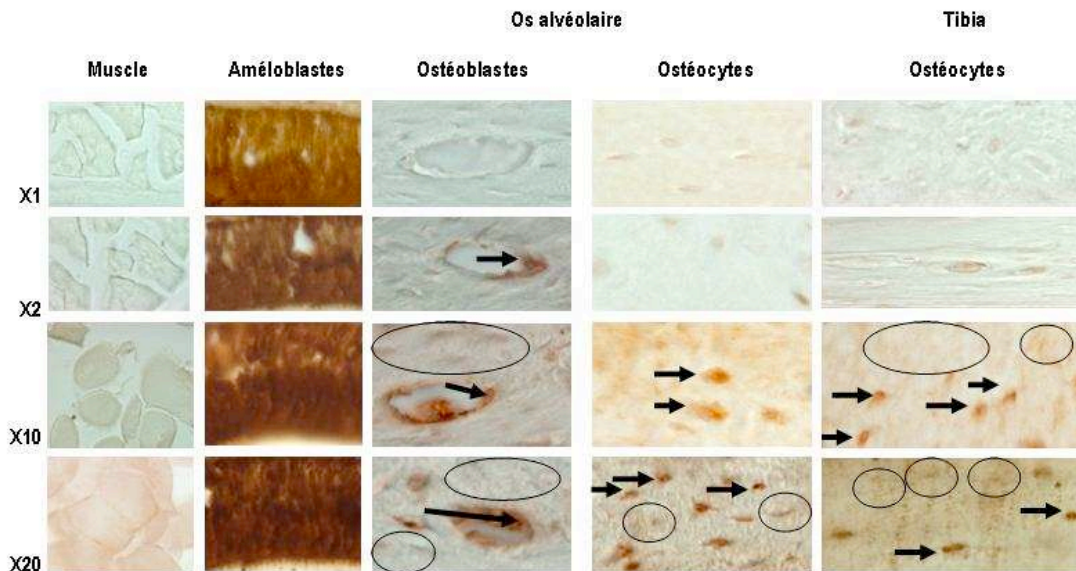
**Figure 33.** Immunomarcage de l'amélogénine chez la souris de 7 jours



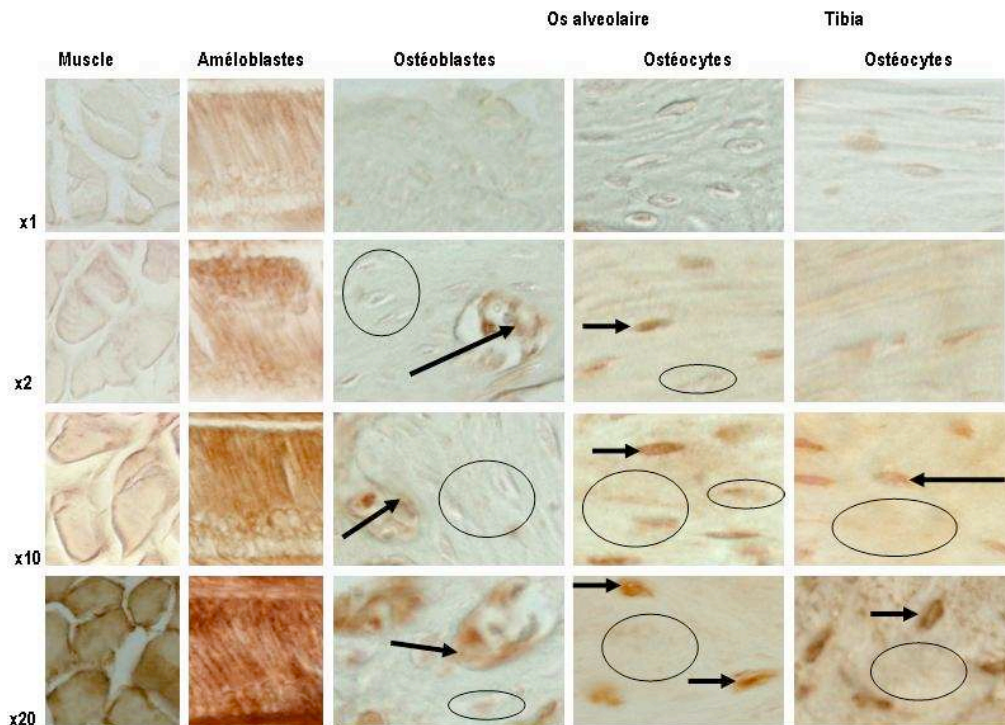
**Figure 34.** Immunomarcage de l'amélogénine chez la souris de 105 jours. Les marquages de l'amélogénine chez les souris de 7 jours et de 105 jours sont plus intenses lorsque la concentration de l'anticorps primaire anti amélogénine augmente. Cette observation est faite au niveau de tous les tissus traités (améloblastes, ostéoblastes, ostéocytes de l'os périodontaire, ostéocytes du tibia et muscle). Les améloblastes de l'incisive montrent un signal à toutes les dilutions (x1 à x20). Le premier signal au niveau du tissu osseux est obtenu à partir d'une concentration de l'anticorps primaire x2. Il est observé au niveau des ostéocytes de l'os périodontoalvéolaire. Le tissu musculaire n'est pas marqué jusqu'à la concentration x10. Pour la dernière concentration (x20), dans tous les tissus traités, y compris dans le tissu témoin, un marquage non spécifique est présent. et considéré comme un faux positif. Les contrôles ont été obtenus avec l'omission de l'anticorps primaire et sans aucun signal (non montré).



**Figure 35.** Immunomarquage de l'améloblastine chez la souris de 7 jours



**Figure 36.** Immunomarquage de l'améloblastine chez la souris de 105 jours Le schéma d'expression de l'améloblastine chez la souris de 7 jours et de 105 jours est semblable à celui de l'amélogénine aux mêmes âges. Le marquage est plus intense pour l'améloblastine, dans les tissus osseux dentaires chez l'animal et de façon plus spécifique dans les cellules ostéoprogénitrices (ostéoblastes) jeunes en croissance (7 jours). Il est plus intense dans les ostéocytes chez l'animal adulte jeune à 105 jours. La concentration de l'anticorps primaire à partir de laquelle le tissu musculaire témoin se colore artéfactuellement est x 20.



**Figure 37. Immunomarquage de l'énaméline chez la souris de 7 jours.** Les améloblastes de l'incisive de souris de 7 jours montrent une coloration d'une intensité croissante avec la concentration de l'anticorps primaire. Le premier signal au niveau du tissu osseux est obtenu à partir d'une concentration de l'anticorps primaire x2. La concentration de l'anticorps primaire à partir de laquelle le tissu musculaire témoin se colore artificiellement est x20.

Les études immunohistologiques ont permis de détecter la présence de l'amélogénine, de l'améloblastine et de l'énaméline au niveau osseux, en utilisant des concentrations d'anticorps primaire beaucoup plus élevées que celles utilisées précédemment pour la détection de ces protéines au niveau dentaire dans notre groupe.

Le premier signal osseux est obtenu à une concentration x2 pour tous les tissus, cette coloration devenant plus intense lorsqu'on concentre l'anticorps primaire. Pour l'ensemble des anticorps, l'utilisation d'une dilution au x1 met en évidence la présence des protéines de l'émail exclusivement dans les améloblastes comme il est classiquement rapporté. La dilution de x2 montre un marquage intense dans les améloblastes, mais aussi dans les odontoblastes et au niveau des matrices amélaire et dentinaire.

L'augmentation de la concentration des anticorps à x10 a montré un signal fort au niveau des ostéocytes, des ostéoblastes et de la matrice osseuse sur les coupes d'os de mandibulaire et du tibia. Le seuil de non-spécificité pour cette technique a été déterminé grâce à la référence négative du muscle qui n'exprime pas les transcrits codant pour les protéines amélaire. Ce témoin est positif à partir d'une dilution de x20, qui en conséquence est exclue de l'étude.

Cette gamme établie dans les tissus de souris adulte, l'expression des protéines au niveau osseux a été donc explorée et montrée dépendre de l'âge et de la région de l'os observée. Nous avons ainsi identifié chez la souris de 7 jours, l'expression des protéines amélaire dans les tissus osseux (mandibule et tibia) au niveau des cellules ostéoprogénitrices, des ostéoblastes et des ostéocytes.

A 105 jours, les protéines s'expriment principalement au niveau des ostéocytes et avec une intensité d'expression très hétérogène. Le fait marquant est que l'expression ostéocytaire est puissante avec l'Amélogénine et l'Améloblastine, ce, avec une constante hétérogénéité dans le marquage de ces cellules (Figures 34 et 36, flèches).

La proportion d'ostéocytes marqués semble être plus prononcée dans les mâchoires par rapport au tibia. Le taux différentiel des ARN observé par RT-QPCR entre les os basal et alvéolaire de la mandibule et le tibia correspondrait donc à un contingent cellulaire variable et non à une quantité intensité variable dans les cellules.

### **V.B.1.c. Adaptation des techniques d'hybridation in situ à la grande précision de la PCR en temps réel**

#### **V.B.1.c.1. Mise au point et évaluation de la technique d'hybridation in situ**

##### *\*Principe de l'Hybridation In situ (HIS)*

L'HIS est la technique de choix pour localiser des séquences d'acides nucléiques cibles sur cellules entières, coupes de tissus ou préparations chromosomiques.

Le principe de la technique est d'utiliser des sondes d'acides nucléiques de séquences connues et marquées. Ces sondes peuvent s'apparier, dans des conditions spécifiques, à des séquences cibles d'ADN ou ARN complémentaires pour former double brin hybride (Terenghi et Fallon, 1990).

L'HIS est un outil essentiel en biologie cellulaire, en génétique et en pathologie pour la détection et la localisation de séquences d'acides nucléiques spécifiques (Speel, 1999).

Cette méthode nécessite une grande rigueur technique et sa sensibilité dépend de nombreuses variables :

- 1 - La technique de préparation histologique pour optimiser la rétention de la cible (ADN ou ARN) dans le tissu et l'accès à la cible.
- 2 - La conception de la sonde (type de sonde et type de marquage).
- 3 - Les conditions d'hybridation et leurs effets sur la formation des hybrides.
- 4 - Les concentrations en sel et la température des rinçages stringents.

##### *\*Choix de la sonde*

La conception de la sonde est un critère essentiel pour la réussite de l'hybridation in situ. Des paramètres de base peuvent affecter la cinétique d'hybridation et/ou les appariements non spécifiques entre séquences. Ils sont à prendre en considération lors de la conception d'une sonde 100% homologue à la séquence cible (Leitch et coll., 1994).

Le choix de la sonde dépend principalement de l'acide nucléique cible et du nombre de copies estimé de sa séquence dans le tissu d'intérêt (résultats en RT QPCR nécessaires avant la mise en œuvre de l'HIS).

Une sonde est un acide nucléique marqué (ADN ou ARN) dont la séquence nucléotidique est complémentaire de l'acide nucléique cible. Le principe d'hybridation repose sur le fait que la séquence nucléotidique de la

sonde doit être antiparallèle à celle de la cible : la cible est orientée 3'=>5', la sonde est orientée 5'=>3'. La structure de la sonde peut être de 3 types : ADN double brin, ARN ou oligonucléotidique (Morel et Cavalier, 2001).

#### \*Sondes ADN double brin

Ces sondes sont des fragments double brin d'ADN génomique correspondant à des séquences spécifiques déjà clonées ou complémentaires d'ARN. Dans ce cas, il s'agit alors le plus souvent d'obtenir l'ADN complémentaire de la séquence d'un ARN messager (on les appelle donc ADN complémentaire ou ADNc). Cette séquence est publiée dans la littérature ou dans une banque de données.

Ces sondes sont très stables (ADN).

#### \*Sondes ARN

Ces sondes sont des simples brins d'ARN (ribosondes) résultant de la transcription *in vitro* d'une séquence d'ADNc cloné dans un plasmide bactérien. Cet ADN, double ou simple brin, est inséré dans un plasmide de transcription contenant des sites de liaison pour l'ARN polymérase (promoteurs T3, T7 et SP6) permettant ainsi la transcription de l'ADN en ARN. Le marquage de la sonde se fait pendant sa synthèse, est stable et d'une moins grande longueur que les sondes ADN. On peut transcrire un brin sens de séquence identique à la cible pour obtenir un contrôle.

L'hybridation avec ces ribosondes résulte en des hybrides ARN-ARN. La température de fusion de ces hybrides est plus élevée que pour les hybrides ADN-ARN. Ceci signifie que l'on peut utiliser des températures d'hybridation et de lavages stringents plus élevées et ainsi empêcher efficacement les liaisons non spécifiques.

#### \*Sondes Oligonucléotides (ADN synthétique)

Ces sondes sont de courtes séquences d'ADN synthétique simple brin complémentaires de celles de l'acide nucléique cible. Les séquences utilisées sont publiées dans la littérature ou dans les banques de données. Elles sont disponibles commercialement (*Tableau 6*).

Les critères de sa conception sont :

- Une séquence complémentaire spécifique de celle de l'acide nucléique cible (l'ADNc publié qui correspond souvent à l'ARNm converti en ADNc, la sonde doit être complémentaire et anti-sens de cet ADNc).
- Une séquence comprenant une région codante (La cible est un ARNm).
- Une absence de séquences palindromiques.
- Une séquence entre 20 et 50 nucléotides.

La longueur de la sonde est un élément important. Il est admis que les sondes longues permettent l'obtention d'hybrides plus stables et spécifiques. En effet, dans le cas d'un hybride long, les deux brins sont maintenus ensemble par plus de liaisons hydrogène et en conséquence plus d'énergie est nécessaire pour dénaturer les deux brins. Cependant, plus la sonde est longue plus le risque d'avoir des appariements non spécifiques



augmente. En conséquence, il faut trouver un compromis entre ces deux facteurs. Il semble que le compromis soit dans l'utilisation de sondes de longueurs comprises entre 20 et 60 pb.

Des sondes simples brins (ARN) longues étaient donc recommandées pour leur grande sensibilité dans la détection de cibles simples brins. Cependant, les sondes oligonucléotidiques sont plus sensibles et leur seuil de détection peut être relevé par l'utilisation d'un cocktail de sondes pouvant s'hybrider avec des régions différentes de la cible.

- Une proportion de la sonde comprenant entre 50 et 55% de guanine et de cytosine.

Les paires GC sont plus stables que les paires A-T/U. En effet, les bases G et C sont liées par 3 liaisons hydrogène quand les bases A et T/U ne sont liées que par deux liaisons hydrogène. Pour cette raison, une sonde avec un contenu élevé en bases G et C est plus stable qu'une sonde dans laquelle les bases A et T prédominent et il faudra plus d'énergie pour séparer les deux brins de l'hybride. Il existe une relation linéaire entre la stabilité des hybrides d'acides nucléiques et le ratio AT:GC. Au moment de la conception de la sonde, il est nécessaire de trouver un compromis respectant un pourcentage optimal de GC.

Pour les oligonucléotides, un contenu en GC aux alentours de 50% permet à la sonde de former des hybrides solides tout en gardant le niveau d'appariements non spécifiques minimum.

- Une absence de séquences palindromiques.

Critères de choix	Sondes		
	ADN double brin	Oligonucléotide	ARN
Disponibilité	++	+++	+
Conservation	+++	+++	+
Stabilité	+++	+++	+
Activité spécifique	++	+	+++
Manipulation	+++	+++	+
Efficacité	+	++	+++
Contrôles	+	++	+++

**Table 6. Critères de choix suivant le type de sonde utilisé (d'après Morel et Cavalier, 2001).**

Les limites de détection de la technique d'hybridation décrite ci-dessus sont estimées inférieures à 50 molécules d'ARNm.

Dans notre étude, notre protocole d'hybridation *in situ* utilisant des ribosondes (Molla et coll., 2010 ; Lézot et coll., 2010 ; Ghoul-Mazgar et coll., 2005) n'a pas révélé de marquage dans les tissus osseux alors que nos

résultats en RT QPCR indiquent dans ces tissus, la présence de faibles quantités d'ARNm des protéines amélaire.

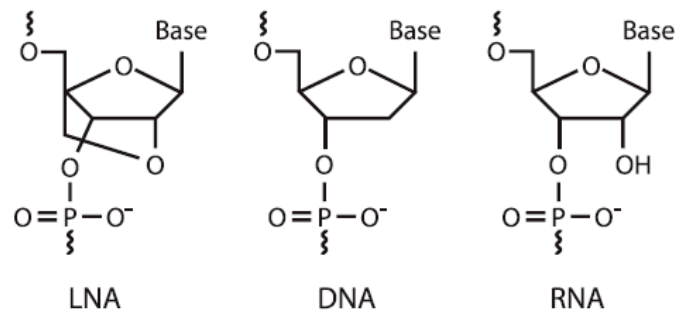
Il nous a donc fallu réévaluer les différents paramètres de notre protocole pour abaisser le seuil de sensibilité nécessaire à la détection de ces faibles quantités d'ARNm. Il faut noter que ces difficultés sont inhérentes aux tissus minéralisés de par l'utilisation d'agents décalcifiants qui extraient les molécules d'intérêt (article 1, Hotton et coll., 1995).

Nous avons mis au point un protocole d'hybridation *in situ* en utilisant des sondes nouvelles, récemment apparues dans la littérature : les sondes oligonucléotidiques modifiées, Locked nucleic Acid (LNA).

Wengel et coll. (1998) ont été les premiers à avoir réalisé l'incorporation de résidus LNA au sein d'un oligonucléotide ADN et à utiliser ces sondes. Les sondes LNA (Locked Nucleic Acid) sont des sondes oligonucléotidiques modifiées par un pont méthylène reliant l'atome d'oxygène en position 2' du ribose au carbone en position 4' (Figure 38).

La conséquence de cette modification est une augmentation significative de la spécificité d'appariement avec leurs cibles, les ARN et une stabilité thermique accrue des duplex (Valoczi et coll., 2004 ; Wienholds et coll., 2005 ; Gupta et Mo, 2011). Elles sont beaucoup utilisées pour localiser les microRNA, dans les stratégies antisens et en thérapeutique en cancérologie.

Elle donne une précision cellulaire semi quantitative selon l'intensité du marquage obtenu.



**Figure 38.** Les LNA (d'après Kaur et coll., 2006)

#### **V.B.1.c.2. Protocole Hybridation *in situ* LNA (en conditions RNase free)**

##### *\*Prélèvement des souris et préparation des échantillons*

Les souris (7 jours et 105 jours) sont sacrifiées par dislocation des vertèbres puis décapitées. Les hémimandibules et les tibias sont prélevés, fixés dans une solution de paraformaldéhyde à 4% dans du PBS1x (Phosphate Buffer Saline) pendant 24 heures à 4°C et sont déminéralisés dans une solution de PBS1x (Euromedex, France) contenant 4.13% d'acide éthylène diamine tétra-acétique (EDTA, Sigma, France), à pH 7.6 pendant 2 à 6 semaines à 4°C selon le tissu et l'âge de la souris.

La solution de décalcification a représenté 10 fois le volume de la pièce anatomique et la solution d'EDTA a été changée au moins deux fois par semaine.

#### \*Paraffine

Après déminéralisation, les échantillons ont été lavés pendant 24 heures au PBS 1X à 4°C, déshydratés dans des solutions d'éthanol de concentration croissante (70-85-95-100%), puis imprégnés en paraffine par immersions successives à 65°C dans du clearene (substitut du toluène, Labonord, France), un mélange clearene-paraffine v/v, puis dans la paraffine et inclus dans des moules adaptés et solidifiés par retour à température ambiante puis à 4°C. Des coupes sériées, frontales et sagittales de 7µ d'épaisseur ont été ensuite effectuées à l'aide d'un microtome RM 2145 (Leica, France). Les coupes ont été déparaffinées dans le clearene pendant 2 fois 5 minutes sous agitation, réhydratées dans des bains d'éthanol de concentration décroissante 100%, 95%, 70%, 50% pendant 5 minutes pour chaque bain, puis rincées dans l'eau et du PBS 1X avant le début du protocole d'immunohistochimie.

- *Coupes paraffine* : Les coupes sériées de 10 µ m sont séchées à l'étuve à 37°C et conservées à – 20°C jusqu'à utilisation. Elles sont fixées dans du PBS 1X- PFA 4% à 4°C pendant 20 minutes après le déparaffinage dans le clearene et la réhydratation dans des alcools décroissants.

#### \*Cryostat

Après déminéralisation, les échantillons sont rincés rapidement au PBS 1x, puis infusés pendant 24 heures à 4°C dans un bain de PBS 1x dans lequel nous avons ajouté 30% de sucrose. Après enrobage dans de l'OCT (Labonord, France), les blocs de tissu sont coupés au cryostat (CM3050 Leica, France) à une température de -30°C. Des coupes de 10 µm sont effectuées suivant un plan frontal ou sagittal et sont recueillies sur des lames histologiques recouvertes de poly-L-lysine (100 mg/ml) (Sigma, France). Puis, elles sont séchées et conservées à -80°C jusqu'à utilisation.

- *Coupes cryostat* : Les coupes sériées de 10 µ m sont fixées dans du PBS 1X- PFA 4% à 4°C pendant 20 minutes en sortant du cryostat et ensuite déshydratées dans l'alcool et conservées à – 20°C jusqu'à utilisation.

#### \*Pré-traitements Jour 1

Les lames sont lavées 3 fois 5 minutes dans PBS 1X, puis les protéines basiques des tissus sont traitées par acétylation pendant 10 minutes sous agitation lente dans une solution de Triéthanolamine 0,1 M dans laquelle on ajoute extemporanément 500 µl d'anhydride acétique. On rince ensuite 5 minutes dans une solution de triéthanolamine 0,1 M.

Les lames sont lavées 3 fois 5 minutes dans PBS 1X

*\*Hybridation jour 1*

Le tampon d'hybridation (THY) est composé de Formamide désionisé 50%, 0,3 M NaCl autoclavé, 20 mM Tris HCl pH 8, autoclavé, 5 mM EDTA autoclavé, 10% Dextran sulfate, 1X Denhardt, 0,5 mg/ml Yeast RNA 0,5 mg/ml Salmon sperm DNA.

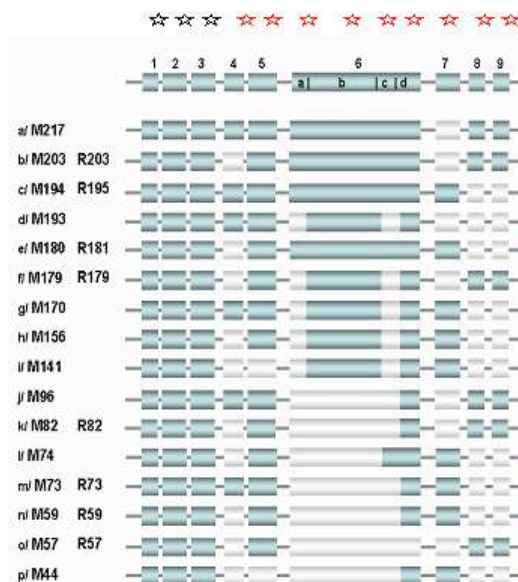
On ajoute 2 µl à 4 µl de sonde LNA amélogénine (Figure 39) (scrambled pour le témoin) marquée à la digoxygénine pour 200 µl de THY.

On chauffe à 65°C pendant 5 minutes pour linéariser la sonde et on place la sonde dans la glace.

L'hybridation est réalisée pendant 16 heures (la nuit) à une température inférieure de 20°C au Tm de la sonde (Tableau 7) et ceci en atmosphère humide.

Gène	Séquence	Longueur	Tm	Concentration
AMELOGENINE	<b>gaggtggtaggggcatagcaaaa</b>	23 mers	82°	40 µM
SCRAMBLED	<b>gtgtaacacgtctatacgccca</b>	22 mers	78°	40 µM

**Tableau 7. Séquences des oligonucléotides (marqués en 5' avec un UTP digoxygénine)**



**Figure 39. La séquence de la sonde Amélogénine a été déterminée au niveau des 3 premiers exons ☆**

Les premiers rinçages stringents sont préparés avec un tampon de 5 X SSC à température ambiante (RT) pendant 15 à 20 minutes, puis dans un tampon composé de 50% Formamide + 0,1% tween + 1 X SSC à la température d'hybridation pendant 2 fois 30 minutes, puis avec du tampon 0,2 X SSC à RT 15 minutes.

Un rinçage en PBS 1X pH7 à RT est effectué pendant 15 minutes.

*\*Solution de Blocage Jour 2*

Le blocage des sites non spécifiques a lieu pendant 2 heures ou le reste de la journée à RT dans la solution de Blocage

0,5% Blocking powder (Roche,)

10% Heat inactivated sheep serum (70°C 30 minutes)

0,1% Tween

1X PBS

*\*Anticorps anti Digoxygénine J2*

Les coupes sont incubées dans l'anticorps antidigoxygénine dilué au 1/200 dans la solution de blocage pendant 1 heure à RT ou dilué au 1/1500 pour la nuit à 4°C.

On rince ensuite dans un tampon PBS 1X Tween 0,1% 2fois 30 minutes.

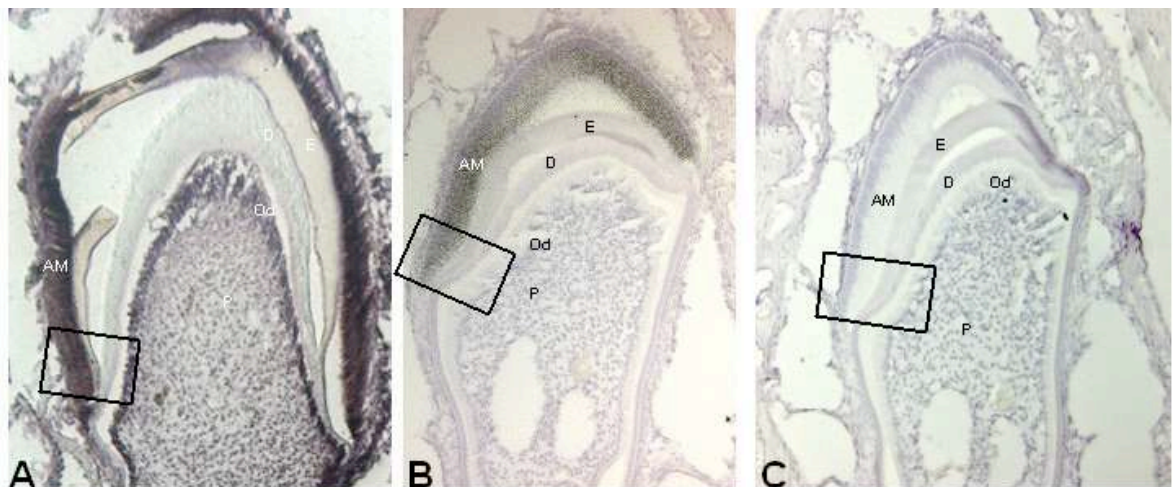
On rince ensuite dans un tampon PBS 1X 2fois 20 minutes

*\*Révélation enzyme substrat*

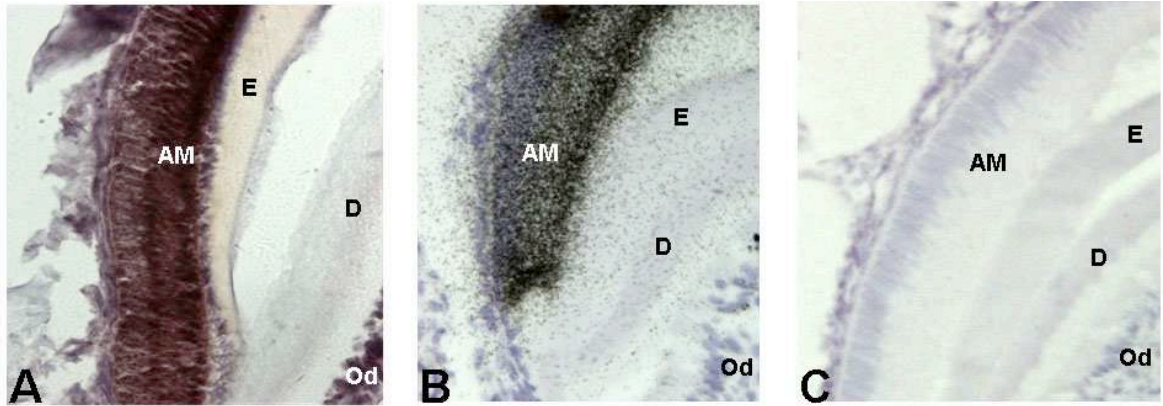
La révélation de la réaction enzyme substrat a lieu dans une solution de NBT/BCIP (BM Purple AP substrate, Roche, France) (avec 2mM Levamisole) de 1h, 16h et 36h à RT en surveillant la coloration au microscope.

Les lames sont ensuite déshydratées dans des bains d'alcool croissants, puis passées dans du clearene avant d'être montées avec des lamelles et de l'Eukitt (Labonord, France).

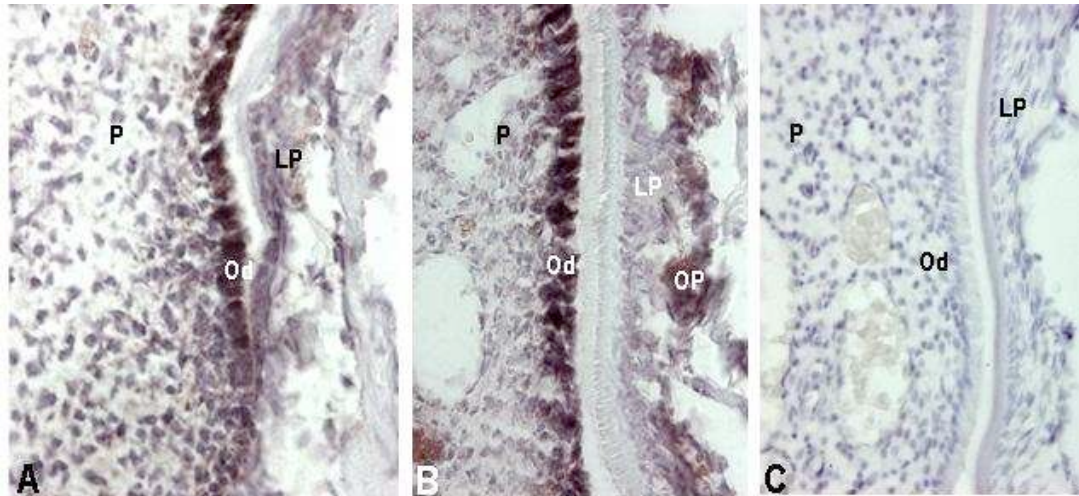
**V.B.1.c.3. Expression des transcrits de l'amélogénine dans les tissu osseux de la mandibule**



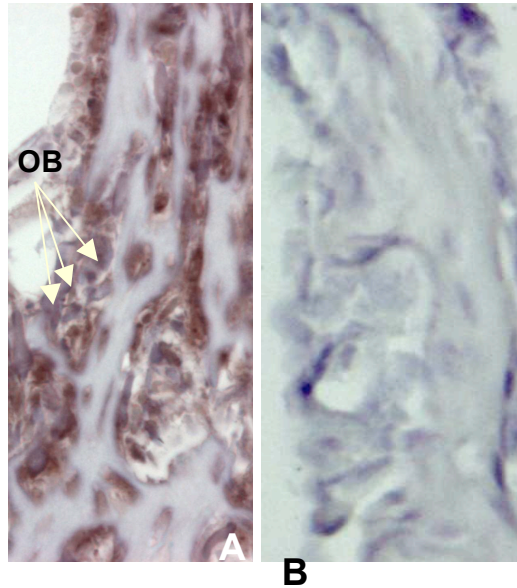
**Figure 40.** Vues générales d'hybridation in situ avec des sondes de l'amélogénine sur des coupes frontales d'incisives de souris âgée de 7 jours. La coupe A montre la présence des transcrits de l'amélogénine par un marquage intense dans les améloblastes (AM), les odontoblastes (Od) et les cellules pulpaires (P). Cette hybridation in situ a été réalisée avec une sonde LNA amélogénine. La coupe B montre la présence des transcrits de l'amélogénine uniquement dans les améloblastes. Cette hybridation a été réalisée avec une sonde ARN marquée au soufre 35. La coupe C est la coupe contrôle (sonde LNA "scrambled" (référence). Elle ne montre aucun marquage.



**Figure 41.** Agrandissements des zones des coupes frontales d'incisives de souris âgées de 7 jours. Sur la coupe (A) hybridée avec une sonde LNA amélogénine marquée à la digoxigénine, on observe une coloration intense des améloblastes (AM) et des odontoblastes (Od). Sur la coupe (B) hybridée avec une sonde ARN amélogénine marquée au Soufre 35, on observe une coloration intense au niveau des améloblastes (AM) essentiellement, avec cependant un signal beaucoup plus faible. La coupe témoin LNA "scrambled" ne montre aucun marquage (C).



**Figure 42.** Hybridation *in situ* avec une sonde LNA de l'amélogénine sur un coupe frontale d'incisive au niveau de la racine. Les odontoblastes (Od), la pulpe (P), les cellules ostéoprogénitrices (OP) et les cellules du ligament parodontal (LP) montrent un marquage. L'hybridation *in situ* avec une sonde "scrambled" marquée à la digoxigénine, ne révèle aucun marquage dans cette zone de la racine dentaire (C).



**Figure 43.** Hybridation *in situ* avec une sonde LNA de l'amélogénine sur une coupe frontale d'incisive au niveau de l'os périodonto-alvéolaire. Les transcrits de l'amélogénine sont localisés au niveau des ostéoblastes et des ostéocytes (Flèches, A). L'hybridation *in situ* d'une coupe sériée avec la sonde "scrambled", ne révèle aucun marquage dans cette zone de l'os périodonto-alvéolaire.

Les hybridations *in situ* ont été réalisées avec différents types de sondes : une sonde ADN oligonucléotidique modifiée par l'insertion de Locked Nucleic Acid (LNA) marquée à la digoxygénine (sonde 1), une sonde ARN (riboprobe) marquée au soufre 35 (sonde 2) et une sonde LNA contrôle scrambled (sonde 3) sur des coupes frontales d'incisive à croissance continue chez la souris sauvage de 7 jours. La comparaison des résultats apporte les données suivantes :

- Les transcrits de l'amélogénine sont détectés dans les améloblastes (*Figures 41 et 42*) avec les sondes 1 et 2. Ces résultats sont en accord avec la littérature du dogme général.
- Les transcrits de l'amélogénine sont détectés dans les odontoblastes (*Figure 42*) avec la sonde 1 mais pas avec la sonde 2. Ces résultats sont également en accord avec la littérature du dogme général car les transcrits de l'amélogénine ont été détectés précédemment par hybridation *in situ* avec des sondes ARN marquées au Souffre 35 dans les jeunes odontoblastes sur tissu non déminéralisé (Papagerakis et coll., 2003).
- La sonde "scrambled", contrôle négatif fourni par Exiqon (Suède), ne révèle aucun marquage.
- Les transcrits de l'amélogénine sont détectés avec la sonde 1 dans les cellules pulpaire et les cellules de la gaine de Hertwig au niveau de la racine de l'incisive à croissance continue. Un fort signal est également présent dans les ostéoblastes et les ostéocytes de l'os périodonto-alvéolaire (*Figure 43*).
- La grande sensibilité de la sonde LNA a donc permis de montrer une présence plus large des transcrits de l'amélogénine au niveau des tissus osseux dento alvéolaires qui correspond aux données obtenues par RT-QPCR et en immunocytochimie.

## **VI - DISCUSSION**

Ce diplôme de doctorat se compose de **deux parties** :

**La première** partie est dédiée à une synthèse de l'apport des méthodes expérimentales établies dans l'incisive de rongeur à croissance continue pour analyser les mécanismes moléculaires de régulation de l'expression des gènes dans la dent in vivo. Elle aboutit à une classification des gènes de la dent selon leurs profils au cours de l'amélogenèse.

**La deuxième partie**, non publiée encore, représente une profonde remise en question de la sensibilité des techniques utilisées par toutes les équipes internationales qui fait clairement émerger les protéines dites « de l'émail » comme des composants matriciels de tous les tissus minéralisés

Une fois encore, le travail produit est consacré aux situations physiologiques et physiopathologiques afin de recentrer les débats fonctionnels sur la situation modélisée par le rongeur, certes, insatisfaisant mais représentatif des pathologies humaines.

### **VI.A. Schémas établis au cours de l'amélogenèse**

La formation des tissus minéralisés résulte de la coordination active de cellules différenciées et spécialisées.

Le développement de la dent est un processus complexe qui résulte d'interactions séquentielles et réciproques entre l'épithélium et le mésenchyme dentaires.

La formation de l'émail est un processus hautement régulé qui implique un contrôle génétique qui sous-tend des interactions protéine-protéine, des interactions protéine-minéral et des interactions avec la membrane cellulaire (Palmer et coll., 2008).

Le processus de différenciation des améloblastes, l'amélogenèse, se fait en plusieurs étapes pendant lesquelles ont lieu des changements morphologiques et fonctionnels qui correspondent à des stades propres du développement. Une croissance considérable est initiée au cours de laquelle la matrice extracellulaire est sécrétée. Ces transformations morphologiques se font en plusieurs phases. Le stade d'initiation voit les cellules provenant de l'épithélium adamantin interne, les préaméloblastes, se différencier progressivement en améloblastes.

Le stade des améloblastes présécréteurs montre des cellules présentant à leur extrémité apicale des irrégularités membranaires associées à la destruction de la membrane basale et qui entrent en contact avec la prédentine.

Le stade sécrétoire est caractéristique d'améloblastes qui sont pourvus d'un appareil sécrétoire médian et distal très développé. Ces cellules synthétisent et sécrètent la matrice organique composée de deux catégories



de protéines, les amélogénines et les non-amélogénines (Hu et coll., 2005). Ces protéines déposent et structurent la phase minérale de l'émail au cours de cette phase de sécrétion. Les cristaux d'apatite croissent sur la totalité de leur longueur puis continuent à se développer en largeur et en épaisseur. La morphogénèse de l'émail est associée à une structure distale, le prolongement de Tomes qui organise des champs intraprismatiques et interprismatiques.

Le stade de maturation est une phase où les améloblastes subissent une transformation cyclique. Le rôle du cytoplasme, qui était principalement de sécréter les protéines, change pour une fonction de transport. Les cellules perdent environ à la moitié de leur taille et développent une bordure plissée distincte située contre la couche minéralisée. A la suite, les cellules prennent une forme avec une bordure lisse. L'activité cellulaire est en relation avec ces deux types de bordure et elle est plus importante dans les cellules à bordure plissée où s'exercent les activités de réabsorption matricielle (Paine et Snead, 2005). Simultanément au retrait de la matrice organique et de son contenu protéique, il y a un flux massif de calcium et de phosphate. Les cristaux d'apatite s'élargissent dans leurs axes a et b. Il en résulte l'édification du tissu le plus dur de l'organisme humain. Ce tissu possède la particularité de ne pas se remodeler.

Au cours du développement, les améloblastes expriment de nombreuses protéines sécrétées qui sont des effecteurs de la biominéralisation :

- 1 - Les amélogénines, l'améloblastine, l'énaméline, la tufteline, la sialoprotéine dentinaire, l'apine, l'amélotine, la Ca ATPase et les calbindines-D<sub>9k</sub> et <sub>28k</sub>, (Berdal et coll., 1993 ; Hotton et coll., 1995), 2- des enzymes, la phosphatase alcaline, la kallibréine 4 et la MMP20 (matrix metalloproteinase) (Hotton et coll., 1999).
- 2 - des molécules qui contrôlèrent leur niveau d'expression : facteurs de transcription, Msx2, Sp3, Sp6, et les Dlx (Lézet et coll., 2000 ; 2008 ; pour revue, Bei, 2009) et molécules signales comme les BMP (Bone Morphogenetic Protein), TGFβ1, SHH et WNT.

Une des originalités de notre travail réside dans le fait que nous analysons les calbindines-D et la phosphatase alcaline, protéines impliquées dans les flux de calcium et de phosphate alors que la majorité des autres équipes ciblent leurs études sur les protéines matricielles.

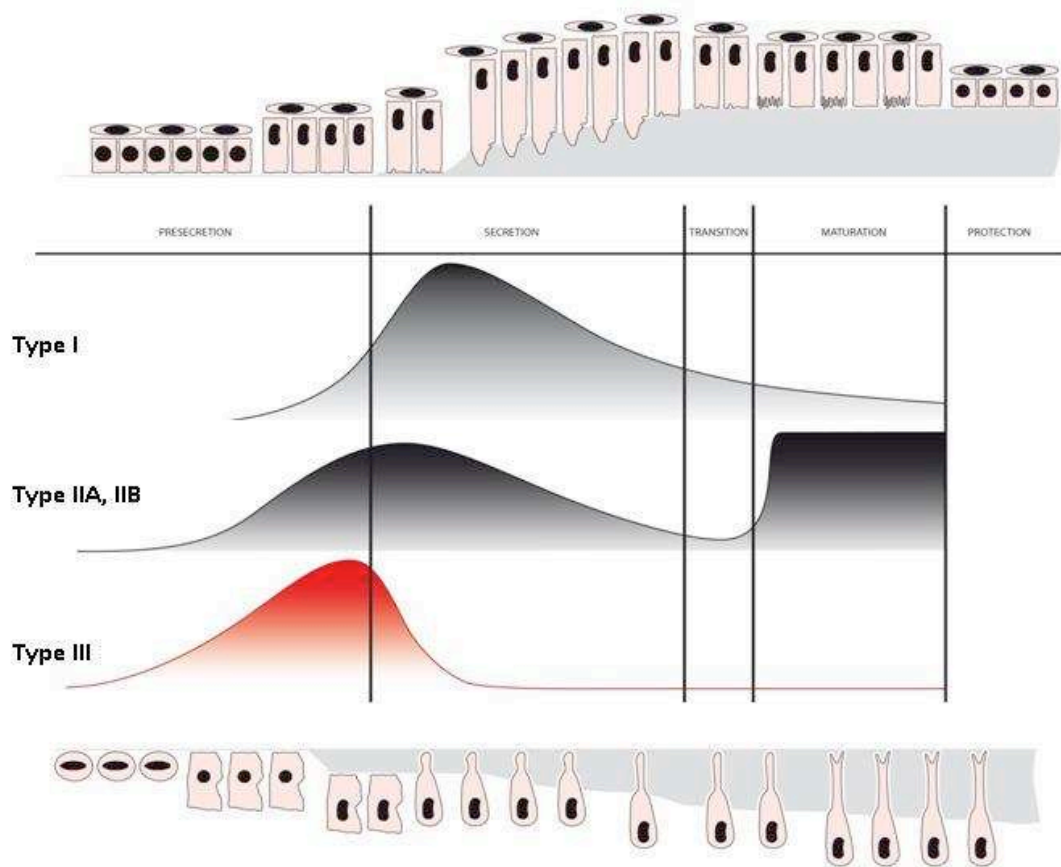
Nos résultats s'incluent dans une analyse fine de la formation du minéral en rapport avec les flux de calcium et de phosphate (Gomez et Boyde, 1994 ; Linde et Lundgren, 1995 ; Takano, 1995 ; Hotton et coll., 1995 ; 1999 ; articles 1 et 2 de cette thèse), les stades du développement cellulaire (Linde et Goldberg, 1993 ; Nanci et Smith, 1993) et la régulation de l'expression des gènes (Davideau et coll., 1996 ; Hotton et coll., 1995, article 1 de cette thèse ; Berdal et coll., 1993 ; 1996 ; Thesleff et Aberg, 1997 ; Zaki et coll., 1996).

Les articles (1-2) de cette thèse et la littérature de l'équipe et des autres groupes montrent que, les patrons d'expression des ARN et des protéines pour les effecteurs de la minéralisation, sont en relation premièrement avec la synthèse de la matrice et secondairement avec l'hyperminéralisation de l'émail.

**En ce qui concerne les ARN**, Il existe un seul pic maximum d'expression des protéines matricielles (amélogénine, améloblastine et enaméline, premier type d'effecteurs de la biominéralisation dentaire) lorsque la sécrétion de l'émail se produit.

Pour des protéines impliquées dans les flux de calcium et de phosphate (phosphatase alcaline, calcium adenosine triphosphatase Ca ATPase, calbindine-D<sub>9k</sub>, calbindine-D<sub>28k</sub>, et parvalbumine,) un premier pic est observé pendant l'étape de sécrétion et puis un deuxième pic pendant la phase de maturation (Hotton et coll., 1995 ; 1999 ; articles 1 et 2 de cette thèse) (Figure 44).

**En ce qui concerne les protéines** : les protéines présentent des fluctuations additionnelles par rapport aux ARN. Les améloblastes de maturation présentent une variation du taux de protéine avec une valeur maximale dans les améloblastes à bordure plissée et minimale dans les améloblastes à bordure lisse.



**Figure 44. Classification des gènes de l'amélogénèse selon leur patron d'expression.** La régulation de ces effecteurs présenterait deux niveaux : un niveau transcriptionnel différent dans les protéines amélares et les gènes impliqués dans les mouvements ioniques et un niveau traductionnel pendant la maturation. Ceci nous conduit à classer les gènes selon leur schéma d'expression. Catégorie I : schéma de type protéines amélares ; Catégorie II : schéma biphasique de type calbindine. Dans cette 2<sup>e</sup> catégorie, on peut classer deux sous-groupes : Certains gènes, s'expriment strictement dans les améloblastes comme les calbindines, c'est le cas de la CaATPase (Type IIA). D'autres gènes comme la phosphatase alcaline, le récepteur de l'EGF, s'expriment en plus dans les cellules supra améloblastiques (type IIB). La littérature et nos travaux (Ritchie et coll., 1997) montrent qu'une troisième catégorie de gènes est identifiable : celui qui s'exprime transitoirement au stade de précrétion, la DSPP. Ceci serait le type III.

Ces schémas différentiels et par catégorie suggèrent que les mécanismes de régulation transcriptionnelle sont communs à chaque catégorie (*Figure 44*). Cependant, aucune donnée de la littérature ne s'est spécifiquement intéressée à identifier les facteurs de transcription impliqués.

Les facteurs testés dans l'équipe de recherche sont codés par deux groupes d'homogènes des familles Msx et Dlx qui sont connus pour intervenir dans la morphogénèse du squelette cranio facial (Tummers et Thesleff, 2008). Leur annulation fonctionnelle chez la souris (Francis-West et coll., 1998) génère des altérations singulières d'unités squelettiques cranio faciales (agénésies dentaires et fente palatine du palais secondaire chez les mutants nuls de Msx1, agénésies ponctuelles des molaires supérieures et atteintes du sphénoïde chez les doubles mutants Dlx1/Dlx2). L'expression locale et sélective des homogènes Msx/Dlx est induite par des facteurs de croissance et de différenciation (BMP2, BMP4, FGF8, Shh,...). Les homéoprotéines Msx/Dlx induisent en retour l'expression de ces facteurs de croissance. Ces communications ont été analysées dans l'initiation du développement dans la morphogénèse et les interactions épithélio-mésenchymateuses. Ainsi, l'étude des homogènes dans le modèle dentaire a élucidé des cascades épigénétiques de l'organogénèse précoce (Davideau et coll., 1999 ; Cobourne et Sharpe, 2010).

L'histogénèse met en jeu une série coordonnée d'effecteurs directs dont certains cités précédemment dans ce chapitre. Les protéines impliquées dans les transferts de calcium (calbindine-D<sub>28K</sub>) et de phosphates (phosphatase alcaline), communes à l'ensemble des tissus minéralisés et les protéines matricielles tissu-spécifiques – amélogénines, améloblastine et énaméline, sialophosphoprotéine de la dentine (DSPP), collagène de types II et IX, aggrécan du cartilage de croissance –collagène de type I et ostéocalcine de l'os. Le contrôle génomique de leur expression ciblée dans les tissus osseux et cartilagineux est associé à des facteurs de transcription de l'ostéoblaste (Runx2, Ostérix) et du chondrocyte (Sox9). Ces facteurs de transcription sont considérés comme des gènes-maîtres, plus spécifiquement Runx2, dont l'inactivation fonctionnelle chez des souris transgéniques annule la différenciation ostéoblastique (Fong et coll., 1999). Des travaux sur les ostéoblastes ont montré que les homéoprotéines Msx2 et Dlx5 inhibent la transcription de l'ostéocalcine (Bidder et coll., 1998). Ainsi, un certain nombre de facteurs de transcription (Runx2 et les familles Msx et Dlx) s'avèrent être à la fois des clés de la régulation de l'expression des protéines de l'histogénèse (Lézot et coll., 2000 ; 2008) et les déterminants des patrons initiaux.

Contrairement à la situation du développement précoce, les signalisations de l'histogénèse et de la biominéralisation étaient mal connues. A ce jour, contrairement à la situation de l'ostéocalcine et de Runx2, aucun facteur déclenchant l'expression constitutive des protéines de l'émail n'a été trouvé.

L'analyse systématique de leur expression des stades précoces aux stades tardifs du développement dentaire a montré que seuls Msx2 et certains Dlx sont exprimés (Lézot et coll., 2000 ; 2008 ; Ghouli-Mazgar et coll., 2005). La modulation de l'expression de Dlx2 dans les cellules épithéliales a été montrée à toutes les étapes de l'amélogenèse (Lézot et coll., 2000). Dans les améloblastes, la première expression optimale de Dlx2 a été

associée à l'étape de présécrétion de l'émail et la seconde expression a été associée à l'étape de maturation d'émail.

Ces données suggèrent que l'expression de gène *Dlx2* puisse se commuter pendant deux étapes successives d'activation/inactivation dans la vie de la même cellule postmitotique (l'améloblaste).

L'expression minimale de *Dlx2* observée ici correspond à l'étape principale du dépôt de matrice d'émail et ainsi aux niveaux optimaux d'expression des gènes de type I (Nanci et coll., 1998).

Ces données suggèrent que *Dlx2* est un antagoniste morphogénétique de l'augmentation de l'épaisseur d'émail.

En effet, *Dlx2* a été montré dans des améloblastes de sécrétion, être exprimé de façon variable selon l'emplacement anatomique de l'émail dans l'incisive. Ces données purement descriptives peuvent être liées à une donnée morphométrique sur les niveaux des ARN messagers de l'amélogénine qui sont avérés proportionnels à l'épaisseur de l'émail dans différents emplacements anatomiques des molaires (Snead et coll., 1988).

En revanche, les cellules supra-améloblastiques montrent un marquage continu de *Dlx2* durant toute l'amélogenèse. Ce comportement différentiel des améloblastes et des cellules supra-améloblastiques est une observation constante pendant toute l'odontogénèse et pourrait être lié aux interactions réciproques générées par le contact avec les cellules de l'ectomésenchyme par l'intermédiaire des molécules de signalisation diffusibles telles que BMP-2/BMP-4 et leurs récepteurs apparentés (Aberg et coll., 1997).

Afin d'établir une relation fonctionnelle entre ces schémas d'expression de facteur de transcription et des gènes de type I, des transfections transitoires de *Dlx2* ont été réalisées. Elles ont montré des sites de liaison pour *Dlx2* qui se comportaient comme activateurs ou inhibiteurs de l'activité du promoteur de l'amélogénine (Lézet et coll., 2008). Des données moléculaires étaient disponibles pour l'homéoprotéine *Msx2* qui se comporte clairement comme un répresseur transcriptionnel des amélogénines (Zhou et coll., 2000). Afin d'établir la fonctionnalité et le caractère effectif de cette répression transcriptionnelle *in vivo*, les travaux d'analyse de l'expression des amélogénines et de l'améloblastine dans les souris mutées pour le gène *Msx2* ont été réalisées (article 4). Ces travaux montrent clairement une inversion des schémas de *Msx2* et des gènes de type I comme pour *Dlx2*. Ces travaux montrent que l'haploinsuffisance des souris *Msx2* +/- correspond à un bénéfice fonctionnel pour l'émail et la production d'amélogénines. Ceci valide le concept que les gènes de type I sont contrôlés *in vivo* par des répresseurs codés par des homéoprotéines. Une telle régulation s'avère aussi opérante pour les gènes de type IIA (calbindine- $D_{28k}$ ) au stade de sécrétion et *in vitro* par étude de promoteur (Bolanos, Hotton, Berdal et Babajko, en préparation). Une approche systématique de ces types de régulation par l'accès à venir de laser-capture permettant une microdissection à l'échelle cellulaire est envisageable pour préciser ce type de proposition fonctionnelle *in vivo*.

Ces mêmes méthodes ont été à la base de nos travaux sur la régulation de l'odontogenèse et de la biominéralisation dentaire par la vitamine D (article 3).

Ainsi une articulation entre les cascades épigénétiques du développement et la biominéralisation se dessine centrée sur le complexe transcriptionnel Msx/Dlx. Nous avons validé l'hypothèse de leur intervention pendant la biominéralisation dans l'incisive à croissance continue de souris. Les homéogènes s'expriment dans les cellules différenciées et des relations morphogénétiques ont été découvertes : une relation linéaire inverse a été établie entre l'épaisseur de l'émail et l'activité du promoteur dans les améloblastes (Lézet et coll., 2000). La quantité d'amélogénines produites détermine l'épaisseur de l'émail. Elle est inversement corrélée aux gradients d'expression de Msx2 et Dlx2. Msx2 agit comme un répresseur *in vitro* (Zhou et coll., 2000). Les Dlx présentent 5 domaines d'interaction montrés fonctionnels sur le promoteur des amélogénines (Lézet et coll., 2008). Nos résultats *in vivo* suggèrent que l'épaisseur de l'émail résulte d'effets opposés des Dlx sur le promoteur des amélogénines (effet direct ou indirect via Msx2) Sa stimulation directe serait réprimée par Msx2 dont l'expression serait induite par Dlx2.

Nous avons établi les bases de régulations croisées existantes entre vitamine D et homéogènes à l'aide d'un modèle de carence nutritionnelle (Papagerakis et coll., 1999, article 3 de cette thèse) et de souris VDR  $-/-$ . Inversement, il a été montré *in vitro* que les homéogènes contrôlent l'expression du récepteur de la vitamine D. La confrontation des résultats *in vivo et in vitro* sur la calbindine- $D_{28k}$  suggère que cette calciprotéine est contrôlée indirectement au travers d'une inhibition de l'expression de Msx2 et Dlx2 par la vitamine D et non au travers du VDRE. La régulation hormonale dans la dent serait donc sous contrôle des voies de signalisation locales.

#### **VI.B. Le mur de Berlin des protéines de l'émail : des certitudes de la tissu-spécificité à la notion d'ubiquité, un équilibre à établir par des approches quantitatives**

Nos données en RT QPCR, en immunohistochimie et en hybridation *in situ* ainsi que des résultats obtenus en Western-blot et en RT QPCR par Jaime JACQUES (travaux de thèse non publiés), confirment que l'expression de l'amélogénine, de l'améloblastine et de l'énaméline ne se limite pas aux tissus dentaires.

Les résultats en RT QPCR précisent que les 3 gènes sont exprimés dans le mésenchyme dentaire à un niveau très proche de celui de l'organe de l'émail dans son intégralité. Les trois protéines de l'émail s'avèrent s'exprimer au niveau du mésenchyme, des os mandibulaires du squelette cranio-facial et au niveau des os du squelette appendiculaire. Cependant, le fait nouveau est la découverte de taux variables suivant le stade de minéralisation (correspondant à l'âge de la souris) et le site anatomique osseux.

Les résultats en immunohistochimie et en hybridation *in situ* confirment que ces 3 protéines sont aussi exprimées dans le mésenchyme et dans les cellules du squelette appendiculaire avec des localisations variables selon le stade de minéralisation (dépendant de l'âge de la souris).

Ces résultats s'opposent à une partie de la littérature cantonnant l'expression des protéines amélaire aux tissus dentaires.

Ils sont en accord avec des recherches plus récentes qui ont réussi à déceler la présence de l'amélogénine et de l'améloblastine au niveau d'autres tissus que la dent.

L'amélogénine a été localisée au niveau des cellules des os longs (ostéoblastes, ostéoclastes, cellules de la moëlle osseuse, cellules périvasculaires, chondrocytes et des cellules souches mésenchymateuses par Haze et coll., en 2007) et au niveau des tissus non minéralisés comme le cerveau, les glandes salivaires, le système hématopoïétique, l'œil et la peau (Deutsch et coll., 2006).

L'améloblastine, elle aussi, a pu être identifiée pendant l'ossification endochondrale et intramembraneuse du souriceau (Spahr et coll., 2006).

L'énaméline, quant à elle, est toujours réaffirmée comme spécifique des cellules dentaires dans un article récent (Papagerakis et coll., 2009).

Pendant quatre décennies, les protéines de l'émail ont été exclusivement considérées comme des protéines structurales, régulant la biominéralisation. Les données en génétique humaine (Lee et coll., 2008) et chez les souris invalidées pour chacun de ces gènes (Gibson et coll., 2001 ; Fukumoto et coll., 2004 ; Hu et coll., 2008) confirment le rôle essentiel joué par ces protéines dans des processus de morphogénèse et de biominéralisation de l'émail. Récemment, cette expression restreinte des protéines amélaire au compartiment ectodermique de la dent a été élargie, dans une première étape, au deuxième compartiment odontogène, le mésenchyme.

La validation de cette donnée a pu être acceptée par la communauté scientifique que par le clonage de l'ADNc de deux amélogénines dans une banque d'odontoblastes publié en 2000 par Veis et coll.

Dans le courant de cet article, la présence de ces protéines a été rapportée, par différentes équipes, au niveau des odontoblastes, de la matrice dentinaire, des cellules pulpaires et du ligament parodontal mais aussi au niveau des cémentoblastes, des cellules de la gaine de Hertwig et des débris épithéliaux de Malassez (Papagerakis et coll., 2003 ; Bosshardt et Nanci, 2004 ; Hatakeyama et coll., 2006 ; article 4 de cette thèse).

Ces recherches ont aussi ouvert la voie d'étude d'un rôle des protéines amélaire qui irait au delà de la seule régulation de la minéralisation amélaire.

Considérer aujourd'hui que les protéines de la matrice extracellulaire participent exclusivement à la biominéralisation de l'émail apparaît réducteur.

Il est désormais démontré que les amélogénines et l'améloblastine sont aussi des molécules de signalisation.

Il y avait une interrogation sur la fonction de l'amélogénine présente au stade de présécrétion de l'améloblaste alors qu'il n'y a pas de formation amélaire. Il avait été admis que les petites isoformes produites par les cellules épithéliales diffusaient au travers de la prédentine pour se déposer au niveau de la matrice dentinaire.

Ces protéines seraient internalisées par l'odontoblaste et détruites au niveau des lysosomes. La diffusion de l'amélogénine diminuerait au fur et à mesure que la dentine se minéralise. Les protéines matricielles amélaire, avaient été proposées, retenues au niveau de la jonction amélodentinaire, pour déclencher ensuite l'initiation de la formation de l'émail (Nanci et coll., 1998).

Des études postérieures ont établi que les amélogénines étaient également produites par les odontoblastes (Veis et coll., 2000 ; Oida et coll., 2002 ; article 3). Les isoformes de bas poids moléculaire seraient en charge des signalisations entre les améloblastes et les odontoblastes pendant le développement de la dent. Ainsi, pendant la morphogenèse dentaire, l'isoforme A-4 inhiberait la maturation fonctionnelle des améloblastes et la sécrétion de la matrice amélaire avant la formation d'une couche de dentine minéralisée. Parallèlement, l'expression de l'isoforme A+4 promouvoir la différenciation de l'odontoblaste et l'induction de l'expression de la sialophosphoprotéine dentinaire (Tompkins et coll., 2002 ; Veis et coll., 2000). Par ailleurs, il a été montré que l'administration in vitro de LRAP recombinante (A-4) au niveau des cellules épithéliales de l'organe de l'émail induit l'augmentation de l'expression du récepteur putatif de LRAP (LAMP-1) et la différenciation de ces cellules (Le et coll., 2007). De plus le rôle des amélogénines ne se réduit pas aux cellules dentaires, améloblastes et odontoblastes. L'orientation ostéochondrogénique observée dans le muscle suite à l'implantation d'une matrice de dentine déminéralisée a été démontré être la conséquence des seules amélogénines. Ce résultat a montré que les amélogénines se comportaient comme des protéines morphogènes osseuses ou BMPs (Veis et coll., 2000).

Ces dernières années, la recherche s'est focalisée sur deux produits de l'épissage alternatif du gène de l'amélogénine : A+4 et A-4 (protéine sans l'exon 4, appelée LRAP). Ces isoformes sont capables d'induire la synthèse de collagène du type II, et de protéoglycanes dans des fibroblastes in vitro. Elles stimulent l'expression de Sox9, facteur de transcription nécessaire pour l'expression du collagène de type II et pour l'entrée dans la voie de la chondrogenèse. Elles déclenchent également l'expression de Runx2 qui détermine le passage des cellules chondrogéniques au stade hypertrophique dans la plaque de croissance, mais qui est surtout un activateur de la différenciation ostéoblastique. On a observé aussi que, l'implantation in vivo de ces molécules induit la prolifération cellulaire et la production d'une matrice cellulaire contenant des marqueurs osseux (BSP), la vascularisation et enfin la minéralisation au niveau d'un site qui normalement ne fabrique pas de tissu osseux, le derme (Veis et coll., 2003).

Ces données permettent de conclure que les amélogénines sont ostéoinductrices, au même titre que les protéines morphogénétiques osseuses ou BMPs (Urist et coll., 1987). En effet, les stratégies expérimentales de Veis et d'Urist ont été conduites en parallèles avec la proposition commune du rôle mutuel de la matrice sur la différenciation des cellules qui la produisent. Depuis lors, la différenciation ostéogénique induite par LRAP (A-4) a été reproduite au niveau des cellules souches embryonnaires de souris et montrée reliée à l'activation de la voie canonique Wnt/ $\beta$ -caténine (Warotayanont et coll., 2009).

Dans le tissu osseux, l'impact des amélogénines sur le contrôle de l'activité des ostéoclastes a été aussi montré. Des défauts d'hyperabsorption cémentaire et alvéolaire sont liés à une augmentation de l'activité de la voie RANK chez la souris invalidée pour AMELX (Hatakeyama et coll., 2006).

In vitro, l'administration de LRAP sur des co-cultures de cémentoblastes et de cellules parodontales induit une réduction de l'expression de RANKL et du nombre de cellules TRAP positives (Hatakeyama et coll., 2006). Ces peptides ont été exploités à des visées thérapeutiques grâce à leurs propriétés de signalisation. Ainsi, l'utilisation des isoformes d'AMEL (A+4 et A-4) au niveau du tissu pulpaire stimule la formation de dentine réparatrice (Six et coll., 2002 ; Lacerda-Pinheiro et coll., 2008). Leur implantation au niveau des tissus mous oriente des cellules CD45+ vers une voie ostéo-chondrogénique, exprimant RP59, Sox9 et la BSP (Lacerda-Pinheiro et coll., 2006). Cependant, le rôle joué pour chacune de ces molécules semble ne pas être le même, avec une action apparemment plus précoce pour LRAP (Jegat et coll., 2007). Ces expériences pourraient induire la formation d'un pont de dentine au niveau d'une exposition de la pulpe dentaire. D'ailleurs, dans le domaine de l'utilisation thérapeutique des peptides amélaire, un des cas les plus remarquables est celui de l'Emdogain, un extrait protéique dérivé de la matrice amélaire du porc, qui est capable de stimuler la régénération des tissus parodontaux et osseux (Gestrelus et coll., 2000).

Récemment, la propriété d'autoassemblage des amélogénines a été exploitée (Xelma) pour des pansements en dermatologie. Les amélogénines forment une matrice de quelques microns d'épaisseur qui est appliquée sur une plaie cutanée profonde. Ces capacités de signalisation leur permettent d'activer la cicatrisation par la sécrétion endogène dans le milieu environnant de facteurs de croissance comme le VEGF et TGF $\beta$ 1 (Romanelli et coll., 2008). Toutes les isoformes des amélogénines seraient indispensables au déroulement de l'odontogenèse, voire à la formation et à l'homéostasie osseuses, avec des fonctions singulières aujourd'hui en cours d'investigation. Par exemple, l'administration exogène du seul peptide LRAP, ne peut restaurer le phénotype dentaire chez la souris KO pour toutes les isoformes de l'amélogénine (Warotayanont et coll., 2008).

De même, l'améloblastine a d'autres fonctions que la cristallogénèse pendant le développement dentaire. Le phénotype du mutant nul de l'améloblastine suggère que cette protéine, la plus abondante après les amélogénines, a un rôle plus large que la seule minéralisation amélaire (Fukumoto et coll., 2004).

Trois isoformes de l'améloblastine ont été identifiées durant la formation de l'émail (Ravindranath et coll., 2007). Leurs synthèses seraient dépendantes de l'avancée du stade de sécrétion en relation avec la sécrétion de l'amélogénine pendant la formation de l'émail. Chaque isoforme pourrait avoir un rôle propre (Simmons et coll., 1998 ; MacDougall et coll., 2000, Lee et coll., 2003).

Le rôle physiologique de l'améloblastine dans le développement des tissus minéralisés reste encore mal connu. L'améloblastine jouerait un rôle dans l'adhésion cellulaire des améloblastes (Fukumoto et coll., 2004), rôle



précisé récemment par l'identification d'un site d'interaction avec la fibronectine via un récepteur de l'intégrine (Beyeler et coll., 2010).

Il a été suggéré que l'améloblastine pourrait avoir une activité similaire à un facteur de croissance (BMP) ou participer à la signalisation cellulaire sous l'influence de facteurs de transcription (Shh) durant le développement dentaire (Fong et coll., 1998 ; Spahr et coll., 2002 ; Takashi., 2007; Sonoda et coll., 2009).

La protéine et l'ARNm de l'améloblastine sont exprimés, en moindre quantité que dans le développement dentaire, pendant l'ossification intramembranaire durant le développement embryonnaire craniofacial du rat ainsi que dans les premiers jours après la naissance. Elle serait une molécule signal qui organise les différentes étapes cellulaires comme la différenciation préostéoblastes/ostéoblastes. Elle est également exprimée au niveau de l'ossification endochondrale dans les cellules prolifératives (Spahr et coll., 2006).

Il a été récemment rapporté que l'améloblastine induirait la réparation du ciment, de la dentine et de l'os, du fait de sa présence dans la matrice extracellulaire de l'os jeune et dans le cartilage pendant l'embryogenèse (Fukae et coll., 2006).

L'étude du mutant nul de l'améloblastine montrait un os cranio facial normal (Fukumoto et coll., 2004) tandis que l'os alvéolaire de ces animaux était poreux et de taille réduite (Wazen et coll., 2009).

L'améloblastine aurait, *in vitro*, le potentiel d'induire le recrutement cellulaire (cellules ostéoprogénitrices, ostéoblastes) et la croissance osseuse *in vitro* et *in vivo* par son action sur l'ostéocalcine et BMP2. Cette stimulation est suivie d'une augmentation de l'expression et de la sécrétion d'un certain nombre de facteurs intervenant dans la réponse immunitaire (IL6, IL8, IL32 et MCP1) (Tamburstuen et coll., 2010).

*In vivo*, sa présence a été rapportée au niveau des cellules osseuses pendant la réparation tissulaire dans l'os néoformé chez les rats adultes (Tamburstuen et coll., 2010).

Le schéma d'expression *in vitro* et *in vivo* (Tamburstuen et coll., 2011) suggère que l'expression de l'améloblastine est associée avec la sécrétion de la matrice osseuse non minéralisée et la formation des cellules osseuses. L'ensemble de ces résultats suggère que cette protéine jouerait un rôle de molécule signal plus large dans la formation et la réparation des tissus osseux dentaire et appendiculaire.

Deux isoformes de l'énaméline ont été identifiées (89 et 32 Kda) (Tanabe et coll., 1990 ; Hu et coll., 1997). Elles seraient impliquées dans l'initiation de la minéralisation, la croissance et l'élongation des cristaux d'émail. Une synergie énaméline-amélogénine démontrée *in vitro* accélère la nucléation de l'hydroxyapatite (Borouopoulos et Moradian-Oldak, 2004).

L'énaméline joue donc un rôle essentiel dans la formation de l'émail mais le mécanisme de régulation de transcription n'est pas clair. Tian et coll. (2010) ont montré qu'il existe une interaction entre le complexe transcriptionnel Béta caténine/LEF1 impliqué dans le développement dentaire et l'énaméline *in vitro*, par l'activation de la transcription du gène. Comme décrit précédemment pour l'améloblastine, l'énaméline agirait

comme une molécule d'adhésion et serait impliquée dans la différenciation cellulaire des améloblastes pendant les premiers stades du développement dentaire.

Malgré cette accumulation de données dans la littérature depuis le travail pionnier de Veis en 2000, de nombreux auteurs considèrent toujours les amélogénines et les protéines de type non-amélogénines comme propres à l'émail.

La difficulté technique pour la préparation, le traitement et l'analyse histologique et biochimique des tissus minéralisés est une possible explication des divergences trouvées dans la littérature. La déminéralisation des tissus calcifiés utilise des agents chélateurs du calcium à la base de l'extraction des protéines de l'émail en biochimie. L'extraction des protéines peut se traduire par l'obtention de faux négatifs, comme cela fût illustré pour les calciprotéines dans les odontoblastes et les ostéoblastes. Une quantification de la densité d'or colloïdal dans les améloblastes avec des anticorps primaires anti calbindine-D<sub>28k</sub> a montré une diminution d'un facteur 2 entre tissus non déminéralisés et tissus déminéralisés à l'EDTA (Berdal et coll., 1991). Les difficultés connues par de nombreux auteurs pour la visualisation dans les odontoblastes a été aussi un sujet délicat (Magloire et coll., 1988 ; Berdal et coll., 1991).

D'une part, le fait que les protéines matricielles aient été toujours considérées, à priori, comme des protéines tissu-spécifiques a conduit à considérer des signaux d'immunomarquage et d'hybridation *in situ* comme des faux positifs dans les autres tissus y compris dans notre groupe et ce, pendant des années.

Disposant de résultats par RT-PCR en temps réel dans la mandibule microdisséquée à 3 mois (thèse de M. Molla), nous avons suivi ces données quantitatives pour prédéfinir les niveaux relatifs d'expression sur une base mesurable. De cette façon, nous avons pu revisiter les autres techniques d'immunohistochimie dans les différents tissus et compléter notre étude par l'utilisation de sondes oligonucléotidiques ADN modifiées (LNA) pour l'hybridation *in situ*.

Nous avons ainsi augmenté le seuil de sensibilité des techniques *in situ* et accepté de «faux positifs». Nous avons réalisé les immunomarquages avec des concentrations croissantes d'anticorps primaires dirigés contre les protéines amélaire sur des coupes de mandibules et de tibias de souris. Nous avons utilisé le tissu musculaire comme témoin négatif, pour déterminer ainsi le seuil de spécificité. Nous avons mise en oeuvre des hybridations *in situ* avec des sondes oligonucléotidiques LNA, s'appariant avec plus d'affinité avec les ARNm faiblement exprimés visés.

D'autre part, des études moléculaires (RT-QPCR) et des études biochimiques complémentaires par Western blot, (travaux de Jaime JACQUES, non publiés) ont apporté des résultats qui concordent pour les différents gènes et les protéines correspondantes dans les différents tissus et à des âges différents.

Nos résultats montrent que toutes les techniques utilisées au cours de cette étude confirment la présence des protéines « amélaire » au niveau osseux.

L'étude immunohistologique a permis de détecter la présence de l'amélogénine, de l'améloblastine et de l'énaméline au niveau osseux, en utilisant une concentration beaucoup plus élevée que celle utilisée précédemment pour la détection de ces protéines au niveau dentaire dans notre groupe.

Le premier signal osseux est obtenu à une concentration d'anticorps primaire x2, cette coloration devenant plus intense lorsqu'on concentre l'anticorps primaire. Pour la gamme entière, l'utilisation d'une concentration d'anticorps primaire x1 met en évidence la présence des protéines de l'émail exclusivement dans les améloblastes comme on le voit dans la littérature. La concentration x2 montre un marquage intense dans les améloblastes, mais aussi dans les odontoblastes et au niveau des matrices amélaire et dentinaire. L'augmentation de la concentration des anticorps x10 a montré un signal fort au niveau des ostéocytes, des ostéoblastes et de la matrice osseuse sur les coupes d'os de la mandibule et du tibia. Le seuil de non-spécificité pour cette technique a été déterminé grâce à la référence négative du muscle qui n'exprime pas les transcrits codant pour les protéines amélaire. Ce témoin est positif à partir d'une concentration x20, et en conséquence exclue dans l'étude. Cette gamme établie dans les tissus de souris adulte, l'expression des protéines au niveau osseux a été donc explorée et montrée dépendre de l'âge et de la région de l'os observée.

Nous avons ainsi identifié chez la souris de 7 jours, l'expression des protéines amélaire dans le tissu osseux mandibulaire au niveau des cellules ostéoprogénitrices, des ostéoblastes et dans une moindre mesure dans les ostéocytes. Dans le tissu osseux du tibia, l'expression des protéines amélaire est présente mais moins forte.

A 105 jours par contre, les protéines s'expriment principalement au niveau des ostéocytes et avec une intensité d'expression hétérogène. Ce profil suggère une possible influence des forces de mastication majeures chez le rongeur, sur l'expression des amélogénines par le fait que l'ostéocyte constitue la cellule réceptrice des contraintes mécaniques (Lanyon et coll., 1993)

Cependant, même si l'on a contribué à améliorer les performances de cette technique, elle ne peut pas nous apporter des données quantitatives, ceci nous conduisant à réaliser d'autres approches. Jaime JACQUES a utilisé la RT-PCR en temps réel dans la perspective de quantifier les taux d'expression des ARN correspondant aux protéines amélaire dans les différents tissus osseux dentaires et appendiculaire. Sa démarche avait pour but de faire une analyse ontogénique de l'expression de l'amélogénine, de l'améloblastine et de l'énaméline comparant des animaux âgés de 7 jours et de 105 jours. Ses résultats confirment la présence des trois protéines amélaire dans les différents tissus osseux dentaires et appendiculaire (non publié).

Les travaux de De la Dure - Molla et coll. (2010) ont montré que les protéines de l'émail s'exprimaient dans les cellules épithéliales et mésenchymateuses, avec un rapport de 1/10 chez les souris de 105 jours. Au niveau de la mandibule, les trois gènes étaient exprimés, avec un gradient d'expression décroissant épithélium > os basal > mésenchyme > os alvéolaire.

Ces résultats sont en désaccord avec les résultats en hybridation *in situ* avec des ribosondes qui suggèrent que l'améloblastine disparaît après la fin du modelage osseux (Spahr et coll., 2006). Notre hypothèse est que l'usage des agents décalcifiants a encore produit de faux négatifs.

Les taux relatifs d'expression des protéines de l'émail dans les tissus non amélaire se basent sur le référentiel de l'organe de l'émail microdisséqué dans son intégralité sous loupe binoculaire. Cependant, la technique de microdissection de l'organe de l'émail incorpore tous les stades des améloblastes, sécrétion, maturation et protection pendant lesquelles le niveau d'expression des protéines de l'émail est très variable. De plus, l'épithélium ne contient pas exclusivement des améloblastes mais aussi les cellules supra-améloblastiques du stratum intermédiaire, du réticulum étoilé et de l'épithélium adamantin externe. Un certain effet de dilution par des cellules n'exprimant pas les protéines amélaire existe dans ce compartiment.

Seule la mise en œuvre de la technique de microdissection laser des améloblastes au stade de sécrétion reflèterait exactement le contexte fonctionnel de l'expression épithéliale. De plus, l'utilisation de la microdissection laser, par sa précision, éliminerait l'hypothèse de la contamination du tissu osseux ou mésenchymateux dentaire par l'organe de l'émail qu'une revue critique de nos travaux ne manquera pas de poser. Cette éventualité nous paraît peu crédible par les données déjà publiées et les résultats obtenus dans les souris *Msx2* *-/-* où chaque gène trouve une modulation spécifique par l'inactivation de *Msx2* cohérente avec le phénotype d'ostéopétrose régionale

Un nombre restreint de publications a déjà rapporté la présence des protéines amélaire au niveau osseux. Celles-ci les décrivent comme des molécules potentiellement multifonctionnelles (Li et coll., 2006). De même, lors de la recherche de notre tissu témoin négatif, nous avons pu retrouver l'expression de ces protéines dans des tissus non minéralisés où leur présence avait déjà été évoquée dans la littérature (cerveau, œil et peau) ou mise en évidence pour la première fois (intestin et rate).

Les protéines amélaire présentent des profils très variables pour les niveaux relatifs entre os alvéolaire et os basal. Lors du passage des souris en croissance aux souris à l'âge adulte, l'expression des protéines devient variable et assez hétérogène. Cette variabilité corrobore assez bien avec l'idée d'hétérogénéité cellulaire retrouvée lors de l'analyse immunohistochimique dans les ostéocytes.

Notre hypothèse est que ces protéines seraient régulées par des conditions biomécaniques, paramètre non considéré dans notre étude (heure des repas par rapport à l'euthanasie, intensité de la fonction masticatoire par la dureté spécifique des aliments,...).

Nous avons initié une nouvelle approche par microdissection laser, avec une fois encore quelques verrous technologiques inhérents à la minéralisation et à la consistance de la MEC à franchir. Cette dernière étape établira définitivement l'identité des résultats *in situ*.

Ce travail chronophage et descriptif peut paraître redondant. Cependant, le domaine des protéines de l'émail est actuellement bloqué par des faux négatifs et des écueils purement méthodologiques qu'il faudrait résoudre pour aborder leurs fonctions en physiopathologie orale.

## VII - CONCLUSION

Ce mémoire montre une expression des protéines matricielles de l'émail dans le tissu osseux. L'intensité et le patron spatiotemporel d'expression sont variables suivant le site anatomique.

Comme cela a été suggéré par d'autres auteurs (Haze et coll., 2007 ; Deutsch et coll., 2006 ; Spahr et coll., 2006) l'expression de ces protéines n'est donc pas l'exclusivité des cellules dentaires d'origine épithéliale. Les protéines amélaire sont aussi exprimées par des cellules d'origine mésenchymateuse (odontoblastes, ostéoblastes et ostéocytes). La mesure de leur taux d'expression révèle des quantités plus importantes dans les os étudiés pendant la croissance. Le fait le plus marquant est la différence entre les os adultes, avec une «signature» mandibulaire caractérisée par une très forte expression de l'amélogénine et l'améloblastine (facteur 1000) et une expression exclusive de l'énaméline.

Les améloblastes, ont une origine épithéliale, les odontoblastes sont des cellules dérivées de la crête neurale. Les ostéoblastes se partagent entre deux origines différentes selon la région anatomique considérée : mésodermique pour les ostéoblastes du squelette vertébral et appendiculaire et neurectodermique pour les ostéoblastes appartenant aux maxillaires et à la face. Une deuxième différence distingue les cellules osseuses maxillo-faciales et le squelette vertébral et appendiculaire. L'os vertébral et appendiculaire dépend dans sa morphogénèse de la combinaison de gènes Hox (homéocode Hox). Les cellules du squelette dento-maxillo-facial n'expriment pas ces gènes (Creuzet et coll., 2002). De plus, l'inactivation de l'homéogène HoxA2 le plus antérieur des gènes du squelette produit une homéose, la duplication du territoire maxillaire (Ren et coll., 2002). La surexpression des gènes Hox dans le territoire Hox-free des mâchoires abolit leur développement. La lamproie est une espèce de transition entre poissons dépourvus de mâchoires (agnates) et pourvus de mâchoires (gnatostomes), signée par l'expression ou non des Hox dans le territoire concerné. Ainsi, l'os des maxillaires est antagoniste fonctionnellement avec l'expression des gènes Hox. Des données récentes montrent une maintenance de cette divergence d'expression chez l'adulte (Leucht et coll., 2008).

Dans le massif maxillo-facial, la morphogénèse dépend d'autres homéogènes divergents des Hox tels que Msx1 et Msx2. Ces gènes présentent aussi des fonctions différentes et une expression spécifique de site anatomique pendant la croissance et l'homéostasie postnatales (Aïoub et coll., 2007 ; Orestes-Cardoso et coll., 2001 ; Berdal et coll., 2009, article 4). L'étude systématique du phénotype de ces souris a montré des relations fonctionnelles avec les protéines de l'émail qui seront revisitées grâce aux repères précis sur la situation basale dans la dent et les os établis dans ce mémoire.

L'hypothèse que les os adultes présentent des caractéristiques site-spécifiques, avec des différences au niveau organique, cellulaire et transcriptomique, commence déjà à être exploré par certains groupes (Rawlinson et

coll., 2009). Les données obtenues dans notre laboratoire, mettent en évidence la composition régionale différente des tissus osseux considérés en général identiques. L'expression et la proportion des protéines dites « amélaire » constituerait ainsi un facteur discriminant des cellules osseuses orales et extra orales.

Cette piste permettra de réaliser une recherche sur le profil singulier du lignage ostéoblastique neuroectodermique. Ainsi, des séries de questions se posent : l'association des protéines amélaire au minéral osseux, leurs interactions mutuelles et avec d'autres protéines matricielles (par exemple l'améloblastine et fibronectine, montrées capables de se lier (Beyeler et coll., 2010), la nature de leurs isoformes, leur clivage protéolytique par des enzymes produits par les ostéoclastes, leur localisation au niveau intra/ extracellulaire et enfin, leurs éventuelles implications fonctionnelles. Les conséquences du phénotype neuroectodermique des cellules osseuses peuvent être multiples, à l'image des activités biologiques des protéines amélaire dans la biominéralisation et des cellules dentaires, ce que peut conférer ses propriétés particulières au processus de minéralisation des os du massif craniofacial.

Notre hypothèse de recherche est que la surexpression osseuse de protéines de l'émail dans la mâchoire est un élément adaptatif à la présence et à la fonction des dents.

La mise au point et le développement des méthodes d'étude réalisés dans ce mémoire constituent des repères concrets de leur analyse. Ils permettront comme cela a été réalisé dans les améloblastes (partie 1 de la thèse) d'analyser les régulations d'expression et de fonctions de ces protéines amélaire dans la physiopathologie.

## VIII - BIBLIOGRAPHIE

- Aberg T, Wozney J, Thesleff I. Expression patterns of bone morphogenetic proteins (Bmps) in the developing mouse tooth suggest roles in morphogenesis and cell differentiation. *Dev Dyn*. 1997 Dec ; 210(4):383-96
- Al-Hashimi N, Sire JY, Delgado S. Evolutionary analysis of mammalian enamelin, the largest enamel protein, supports a crucial role for the 32-kDa peptide and reveals selective adaptation in rodents and primates. *J Mol Evol*. 2009. 69(6):635-56.
- Aïoub M, Lézot F, Molla M, Castaneda B, Robert B, Goubin G, Néfussi JR, Berdal A. Msx2 <sup>-/-</sup> transgenic mice develop compound amelogenesis imperfecta, dentinogenesis imperfecta and periodontal osteopetrosis. *Bone*. 2007, 41(5):851-9.
- Airaksinen MS, Eilers J, Garaschuk O, Thoenen H, Konnerth A, Meyer M. Ataxia and altered dendritic calcium signaling in mice carrying a targeted null mutation of the calbindin D<sub>28k</sub> gene. *Proc Natl Acad Sci*. 1997, 94:1488-1493.
- Anderson HC, Garimella R, Tague SE. The role of matrix vesicles in growth plate development and biomineralization. *Front Biosci*. 2005. 10:822-37.
- Arana-Chavez VE, Massa LF. Odontoblasts: the cells forming and maintaining dentine. *Int J Biochem Cell Biol*. 2004. 36(8):1367-73.
- Ba X, Rafailovich M, Meng Y, Pernodet N, Wirick S, Füredi-Milhofer H, Qin Y, DiMasi E. Complementary effects of multi-protein components on biomineralization in vitro. *J Struct Biol*. 2010, 170(1):83-92.
- Baba O, Takahashi N, Terashima T, Li W, DenBesten PK, Takano Y. Expression of alternatively spliced RNA transcripts of amelogenin gene exons 8 and 9 and its end products in the rat incisor. *J Histochem Cytochem*. 2002 ; 50(9):1229-36
- Bailleul-Forestier I, Davideau JL, Papagerakis P, Noble I, Nessmann C, Peuchmaur M, Berdal A. Immunolocalization of vitamin D receptor and calbindin-D<sub>28k</sub> in human tooth germ. *Pediatr Res*. 1996. 39(4):636-42.
- Balmain N, Brehier A, Cuisinier-Gleizes P, Mathieu H. Evidence for the presence of Calbindin-D<sub>28k</sub> (CaBP<sub>28k</sub>) in the tibial growth cartilages of rats. *Cell Tissue Res*. 1986;245(2):331-5.
- Bartlett, J.D., Ball R.L., Kawai T., Tye C.E., Tsuchiya M., Simmer J.P. Origin, splicing, and expression of rodent amelogenin exon 8. *J Dent Res* 2006. 85 894-9.
- Bartlett, J.D., Simmer, J.P. Proteinases in developing dental enamel. *Crit Rev Oral Biol Med*. 1999. 10 425-41.
- Beertsen W, Niehof A. Root-analogue versus crown-analogue dentin: a radioautographic and ultrastructural investigation of the mouse incisor. *Anat Rec*. 1986. 215(2):106-18
- Begue-Kirn C., Krebsbach P.H., Bartlett J.D., Butler W.T. Dentin sialoprotein, dentin phosphoprotein, enamelysin and ameloblastin: tooth-specific molecules that are distinctively expressed during murine dental differentiation. *Eur J Oral Sci*. 1998. 106 963-70.
- Bei M. Molecular genetics of tooth development. *Curr Opin Genet Dev*. 2009. 19(5):504-10
- Bellido T., Huening M., Raval-Pandya M., Manolagas SC., Christakos S. Calbindin-D<sub>28k</sub> is expressed in osteoblastic cells and suppresses their apoptosis by inhibiting caspase-3 activity. *Journal of biological chemistry*, 2000, Vol. 275, 34, 26328-26332.
- Berdal A., Balmain N., Brehier A., Hotton D., Cuisinier-Gleizes P., Mathieu H. Immunological characterization, developmental pattern and vitamin-D-dependency of calbindin D<sub>28k</sub> in rat teeth ameloblasts. *Differentiation*, 1989a, 40(1): 27-35.

- Berdal A., Balmain N., Thomasset M., Brehier A., Hotton D., Cuisinier-Gleizes P., Mathieu H. Calbindins-D<sub>9kDa</sub> and D<sub>28kDa</sub> and enamel secretion in vitamin D-deficient and control rats. *Connect Tissue Res*, 1989b, 22(1-4) : 165-71.
- Berdal A., Nanci A., Smith Ce., Ahluwalia Jp., Thomasset M., Cuisinier-Gleizes P., Mathieu H. 1991. Differential expression of calbindin-D<sub>28k</sub> in rat incisor ameloblasts throughout enamel development. *Anat Rec*, 230 : 149-143.
- Berdal A., Hotton D., Pike Jw., Mathieu H., Dupret Jm. Cell- and stage-specific expression of vitamin D receptor and calbindin genes in rat incisor: regulation by 1,25-dihydroxyvitamin D3. *Dev Biol*, 1993, 155 : 172-179.
- Berdal, A., D. Hotton, J.L. Saffar, M. Thomasset, A. Nanci. Calbindin-D9k and calbindin-D28k expression in rat mineralized tissues in vivo. *J Bone Miner Res* .1996. 11: 768-79.
- Berdal A, Molla M, Hotton D, Aioub M, Lezot F, Néfussi JR, Goubin G. Differential impact of Msx1 and Msx2 homeogenes on mouse maxillofacial skeleton. *Cells Tissues Organs*. 2009 ; 189: 126-132.
- Berdal A, Molla M, Descroix V. 2011 *Vitamin D and Oral Health*, Academic Press; pp 521-528
- Beyeler M, Schild C, Lutz R, Chiquet M, Trueb B. Identification of a fibronectin interaction site in the extracellular matrix protein ameloblastin. *Exp Cell Res*. 2010, 316 (7): 1202-12
- Bidder M, Latifi T, Towler DA. Reciprocal temporospatial patterns of Msx2 and Osteocalcin gene expression during murine odontogenesis. *J Bone Miner Res*. 1998, 13 (4): 609-19
- Birk DE, Nurminskaya MV, Zycband EI. Collagen fibrillogenesis in situ: fibril segments undergo post-depositional modifications resulting in linear and lateral growth during matrix development. *Dev Dyn. Mar*, 1995; 202 (3): 229-43.
- Bonass, W.A., Kirkham, J., Brookes, S.J., Shore, R.C., Robinson, C. Isolation and characterisation of an alternatively-spliced rat amelogenin cDNA: LRAP-a highly conserved, functional alternatively-spliced amelogenin. *Biochim Biophys Acta*, 1994, 1219 690-2.
- Bonewald L.F. Osteocytes as dynamic multifunctional cells. *Ann N Y Acad Sci*. 2007. 1116, 281-90.
- Bouropoulos, N., Moradian-Oldak, J. Induction of apatite by the cooperative effect of amelogenin and the 32-kDa enamelin. *J Dent Res* 2004, 83 278-82.
- Boskey AL, Spevak L, Doty SB, Rosenberg L. Effects of bone CS-proteoglycans, DS-decorin, and DS-biglycan on hydroxyapatite formation in a gelatin gel. *Calcif Tissue Int*. 1997. 61(4):298-305.
- Bosshardt, D.D., Nanci, A. Immunolocalization of epithelial and mesenchymal matrix constituents in association with inner enamel epithelial cells. *J Histochem Cytochem*, 1998. 46 135-42.
- Bosshardt, D.D., Nanci, A. Immunocytochemical characterization of ectopic enamel deposits and cementicles in human teeth. *Eur J Oral Sci*, 2003, 111 51-9.
- Bosshardt, D.D., Nanci, A. Hertwig's epithelial root sheath, enamel matrix proteins, and initiation of cementogenesis in porcine teeth. *J Clin Periodonto*, 2004, 31 184-92.
- Brekken R.A, Sage E.H. SPARC, a matricellular protein: at the crossroads of cell-matrix communication. *Matrix Biol*. 2001, 19:816–27
- Brookes, S.J., Kirkham, J., Shore, R.C., Wood, S.R., Slaby, I., Robinson, C. Amelin extracellular processing and aggregation during rat incisor amelogenesis. *Arch Oral Biol*, 2001, 46 201-8.
- Buchaille R, Couble ML, Magloire H, Bleicher F. 2000. Expression of the small leucine-rich proteoglycan osteoadherin/osteomodulin in human dental pulp and developing rat teeth. *Bone*, 27(2):265-70



- Butler Wt., Ritchie M. The nature and functional significance of dentin extracellular matrix extracellular matrix protein. *Int J Dev Biol*, 1995, 39 : 166-179.
- Butler WT, Brunn JC, Qin C. Dentin extracellular matrix (ECM) proteins: comparison to bone ECM and contribution to dynamics of dentinogenesis. *Connect Tissue Res*. 2003;44 Suppl 1:171-8.
- Caterina, J.J., Skobe, Z., Shi, J., Ding, Y., Simmer, J.P., Birkedal-Hansen, H., Bartlett, J.D. Enamelysin (matrix metalloproteinase 20)-deficient mice display an amelogenesis imperfecta phenotype. *J Biol Chem* 2002, 277. 49598-604.
- Chen, W.Y., Bell, A.W., Simmer, J.P., Smith, C.E. Mass spectrometry of native rat amelogenins: primary transcripts, secretory isoforms, and C-terminal degradation. *J Dent Res* 2000, 79 840-9.
- Chen, E., Yuan, Z.A., Wright, J.T., Hong, S.P., Li, Y., Collier, P.M., Hall, B., D'Angelo, M., Decker, S., Piddington, R., Abrams, W.R., Kulkarni, A.B., Gibson, C.W. The small bovine amelogenin LRAP fails to rescue the amelogenin null phenotype. *Calcif Tissue Int* 73 (2003) 487-95.
- Chen, D., Zhao, M., Mundy, G.R. Bone morphogenetic proteins. *Growth Factors* 2004 (22) 233-41.
- Cho, S.W., Kim, J.Y., Cai, J., Lee, J.M., Kim, E.J., Lee, H.A., Yamamoto, H., Jung, H.S. Temporospatial tissue interactions regulating the regeneration of the enamel knot in the developing mouse tooth. *Differentiation* 2007;75: 158-65
- Christakos S, Norman Aw. Studies on the mode of action of calciferol. XVIII. Evidence for a specific high affinity binding protein for 1,25 dihydroxyvitamin D3 in chick kidney and pancreas. *Biochem Biophys Res Commun*. 1979, 89(1):56-63.
- Christakos S, Prince R. Estrogen, vitamin D, and calcium transport. *J Bone Miner. Res*. 2003 18(10):1737-9.
- Christakos S, Liu Y. Biological actions and mechanism of action of calbindin in the process of apoptosis. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2004 May;89-90(1-5):401-4.
- Christakos S., Liu Y., Dhawanp. , Peng X. The calbindins: calbindin D9k and calbindin D28K, in: D. Feldman, J.W. Pike, F.H. Glorieux (Eds.), *Vitamin D*, 2nd ed., Chapter 42, Academic Press, San Diego, CA, 2005, pp. 721–735.
- Clarke, B. Normal bone anatomy and physiology. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2008, 3 Suppl 3, S131-9.
- Clark CJ, Sage EH., A prototypic matricellular protein in the tumor microenvironment—where there's SPARC, there's fire. *J Cell Biochem*. 2008, 104:721–32
- Cobourne MT, Sharpe PT. Making up the numbers: The molecular control of mammalian dental formula. *Semin Cell Dev Biol*. 2010, (3):314-24.
- Colnot S, Lambert M, Blin C, Thomasset M, Perret C. Identification of DNA sequences that bind retinoid X receptor-1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>-receptor heterodimers with high affinity. *Mol Cell Endocrinol*. 1995, 30;113(1):89-98.
- Corpus LM, Funderburgh JL, Funderburgh ML, Bottomley GS, Prakash S, Conrad GW. : Molecular cloning and tissue distribution of keratan. Bovine corneal keratan sulfate proteoglycan 37A. *J Biol Chem*. 1996, 19;271(16):9759-63
- Creuzet S, Couly G, Vincent C, Le Douarin NM. Negative effect of Hox gene expression on the development of the neural crest-derived facial skeleton. *Development*. 2002 ;129(18):4301-13.
- Davideau JI, Sahlberg D., Blin C., Papagerakis P., Thesleff I., Berdal A. - Differential expression of the full-length and secreted truncated forms of EGF receptor during formation of dental tissues. *Int J Dev Biol*, 1995, 39 : 605-615
- Davideau JI., Papagerakis P., Hotton D., Lézot F., Berdal A. In situ investigation of vitamin D receptor, alkaline phosphatase, and osteocalcin gene expression in oro-facial mineralized tissues. *Endocrinology*, 1996, 137 : 3577-3585.

- Davideau JL, Demri P, Hotton D, Gu TT, MacDougall M, Sharpe P, Forest N, Berdal A. Comparative study of MSX-2, DLX-5, and DLX-7 gene expression during early human tooth development. *Pediatr Res*. 1999; 46(6):650-6
- De Luca HF, Recent advances in our understanding of the vitamin D endocrine system. *J Lab Clin Med*. 1976, 87(1):7-26. Review
- Deutsch D, Haze-Filderman A, Blumenfeld A, Dafni L, Leiser Y, Shay B, Gruenbaum-Cohen Y, Rosenfeld E, Fermon E, Zimmermann B, Haegewald S, Bernimoulin JP, Taylor AL. Amelogenin, a major structural protein in mineralizing enamel, is also expressed in soft tissues: brain and cells of the hematopoietic system. *Eur J Oral Sci*. 2006;114 Suppl 1
- Dhamija S, Liu Y, Yamada Y, Snead ML, Krebsbach PH. Cloning and characterization of the murine ameloblastin promoter. *J Biol Chem*. 1999, 16;274(29):20738-43
- Diekwisch TG, Jin T, Wang X, Ito Y, Schmidt M, Druzinsky R, Yamane A, Luan X. Amelogenin evolution and tetrapod enamel structure. *Front Oral Biol*. 2009; 13:74-9.
- Diekwisch, T.G. The developmental biology of cementum. *Int J Dev Biol* 2001, 45, 695-706.
- Dohi, N., Murakami, C., Tanabe, T., Yamakoshi, Y., Fukae, M., Yamamoto, Y., Wakida, K., Shimizu, M., Simmer, J.P., Kurihara, H., Uchida, T. Immunocytochemical and immunochemical study of enamelines, using antibodies against porcine 89-kDa enamelin and its N-terminal synthetic peptide, in porcine tooth germs. *Cell Tissue Res* 1998, 293, 313-25.
- Dong J, Gu TT, Simmons D, MacDougall M. Enamelin maps to human chromosome 4q21 within the autosomal dominant amelogenesis imperfecta locus. *Eur J Oral Sci.*, 2000, 108(5):353-8.
- D'Souza RN, Cavender A, Sunavala G, Alvarez J, Ohshima T, Kulkarni AB, MacDougall M. Gene expression patterns of murine dentin matrix protein 1 (Dmp1) and dentin sialophosphoprotein (DSPP) suggest distinct developmental functions in vivo. *J Bone Miner Res*. 1997; 12(12):2040-9.
- Ducy, P. Cbfa1: a molecular switch in osteoblast biology. *Dev Dyn* 2000, 19, 461-71.
- Embery G, Hall R, Waddington R, Septier D, Goldberg M. Proteoglycans in dentinogenesis. *Crit. Rev. Oral Biol. Med.* 2001, 12:331-49
- Eyre D. Collagen of articular cartilage. *Arthritis Res*. 2002, 4:30-35
- Fan D, Lakshminarayanan R, Moradian-Oldak J. The 32kDa enamelin undergoes conformational transitions upon calcium binding. *J Struct Biol*. 2008; 163(1):109-15
- Fan D, Du C, Sun Z, Lakshminarayanan R, Moradian-Oldak J. In vitro study on the interaction between the 32 kDa enamelin and amelogenin. *J Struct Biol*. 2009 166(1):88-94
- Feher JJ, Fullmer CS. Facilitated diffusion of calcium by calcium-binding protein: its role in intestinal calcium absorption.. *Prog Clin Biol Res*. 1988;252:121-6
- Feng JQ, Luan X, Wallace J, Jing D, Ohshima T, Kulkarni AB, D'Souza RN, Kozak CA, MacDougall M. Genomic organization, chromosomal mapping, and promoter analysis of the mouse dentin sialophosphoprotein (Dspp) gene, which codes for both dentin sialoprotein and dentin phosphoprotein. *J Biol Chem*. 1998, 273(16):9457-64
- Ferguson, C., Alpern, E., Miclau, T., Helms, J.A. Does adult fracture repair recapitulate embryonic skeletal formation ? *Mech Dev*. 1999, 87, 57-66.
- Fincham, A.G., Moradian-Oldak, J., Diekwisch, T.G., Lyaruu, D.M., Wright, J.T., Bringas, P., Jr., Slavkin, H.C. Evidence for amelogenin "nanospheres" as functional components of secretory-stage enamel matrix. *J Struct Bio*, 1995 115, 50-9.

- Fincham, A.G. and Moradian-Oldak, J. Comparative mass spectrometric analyses of enamel matrix proteins from five species suggest a common pathway of post-secretory proteolytic processing. *Connect Tissue Res*, 1996 :35 151-6.
- Fincham, A.G., Moradian-Oldak, J., Simmer, J.P. The structural biology of the developing dental enamel matrix. *J Struct Biol*, 1999, 126, 270-99.
- Fong, C.D., Slaby, I., Hammarstrom, L. Amelin. An enamel-related protein, transcribed in the cells of epithelial root sheath. *J Bone Miner Res*, 1996, 11; 892-8.
- Fong, C.D., Cerny, R., Hammarstrom, L., Slaby, I. Sequential expression of an amelin gene in mesenchymal and epithelial cells during odontogenesis in rats. *Eur J Oral Sci*, 1998, 106 Suppl 1, 324-30.
- Fong, C.D., Hammarstrom, L. Expression of amelin and amelogenin in epithelial root sheath remnants of fully formed rat molars. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, 2000, 90, 218-23.
- Fowler, C.E., Beniash, E., Yamakoshi, Y., Simmer, J.P., Margolis, H.C. Cooperative mineralization and protein self-assembly in amelogenesis: silica mineralization and assembly of recombinant amelogenins in vitro. *Eur J Oral Sci*, 2006, 114 Suppl 1, 297-303.
- Francis-West P, Ladher R, Barlow A, Graveson A. Signalling interactions during facial development. *Mech Dev*. 1998;75(1-2):3-28. Review.
- Fukae, M., Tanabe, T. Degradation of enamel matrix proteins in porcine secretory enamel. *Connect Tissue Res*, 1998, 391, 23-9; discussion 141-9.
- Fukae, M., Kanazashi, M., Nagano, T., Tanabe, T., Oida, S., Gomi, K. Porcine sheath proteins show periodontal ligament regeneration activity. *Eur J Oral Sci*, 2006, 114 Suppl 1 212-8; discussion 254-6, 381-2.
- Fukumoto, S., Kiba, T., Hall, B., Iehara, N., Nakamura, T., Longenecker, G., Krebsbach, P.H., Nanci, A., Kulkarni, A.B. Yamada, Y. Ameloblastin is a cell adhesion molecule required for maintaining the differentiation state of ameloblasts. *J Cell Biol*, 2004 :167, 973-83.
- Fukumoto S, Yamada Y. Review: Extracellular matrix regulates tooth morphogenesis. *Connective Tissue Research*. 2005. 46: 220–226.
- Furie B, Bouchard BA, Furie BC. 1999. Vitamin K-dependent biosynthesis of gamma-carboxyglutamic acid. *Blood* 93:1798–808
- Gao Y, Yang G, Weng T, Du J, Wang X, Zhou J, Wang S, Yang X. Disruption of Smad4 in odontoblasts causes multiple keratocystic odontogenic tumors and tooth malformation in mice. *Mol Cell Biol*. 2009;29(21):5941-51.
- Gestrelus, S., Lyngstadaas, S.P., Hammarstrom, L. Emdogain--periodontal regeneration based on biomimicry. *Clin Oral Investig*, 2000, 4, 120-5.
- Ghoul-Mazgar S, Hotton D, Lézot F, Blin-Wakkach C, Asselin A, Sautier JM, Berdal A. Expression pattern of Dlx3 during cell differentiation in mineralized tissues, *Bone*, 2005, 37, 799–809.
- Gibson C., Golub E., Herold R., Risser M., Ding W., Shimokawa H., Young M., Termine J. Rosenbloom, J. Structure and expression of the bovine amelogenin gene. *Biochemistry* 1991a, 30, 1075-9.
- Gibson, C.W., Golub, E., Ding, W.D., Shimokawa, H., Young, M., Termine, J., Rosenbloom, J. Identification of the leucine-rich amelogenin peptide (LRAP) as the translation product of an alternatively spliced transcript. *Biochem Biophys Res Commun* 1991b: 174 1306-12.
- Gibson, C.W., Golub, E.E., Abrams, W.R., Shen, G., Ding, W., Rosenbloom, J. Bovine amelogenin message heterogeneity: alternative splicing and Y-chromosomal gene transcription. *Biochemistry*, 1992:31 8384-8.

- Gibson CW. Regulation of amelogenin gene expression. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr*; . 1999, 9(1):45-57.
- Gibson, C.W., Yuan, Z.A., Hall, B., Longenecker, G., Chen, E., Thyagarajan, T., Sreenath, T., Wright, J.T., Decker, S., Piddington, R., Harrison, G., Kulkarni, A.B. Amelogenin-deficient mice display an amelogenesis imperfecta phenotype. *J Biol Chem*, 2001, 276 31871-5.
- Gibson, C.W., Kulkarni, A.B. and Wright, J.T.: The use of animal models to explore amelogenin variants in amelogenesis imperfecta. *Cells Tissues Organs* 2005, 181, 196-201.
- Gifford JI, Walsh Mp, Vogel Hj. Structures and metal-ion-binding properties of the Ca<sup>2+</sup> binding helix-loop-helix EF Hand motifs. *Biochem J*.2007. 405: 199-221.
- Gill RK, Christakos S. Identification of sequence elements in mouse calbindin-D28k gene that confer 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>- and butyrate-inducible responses. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993, 1; 90 7: 2984-8.
- Glorieux FH. Pseudo-vitamin D deficiency rickets. *J Endocrinol*. 1997;154 Suppl:S75-8.
- Gollub E. Role of matrix vesicles in biomineralization. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2009. 1790, 1592–1598. Review.
- Gomes CC, Duarte AP, Diniz MG, Gomez RS. Current concepts of ameloblastoma pathogenesis. *J Oral Pathol Med*. 2010 39(8):585-91.
- Gomez S, Boyde A. Correlated alkaline phosphatase histochemistry and quantitative backscattered electron imaging in the study of rat incisor ameloblasts and enamel mineralization. *Microsc Res Tech*. 1994, 1; 29(1):29-36.
- Gopinath VK, Yoong TP, Yean CY, Ravichandran M. Identifying polymorphism in enamelin gene in amelogenesis imperfecta (AI). *Arch Oral Biol*. 2008; 53 (10): 937-40
- Gruenbaum-Cohen Y, Tucker AS, Haze A, Shilo D, Taylor AL, Shay B, Sharpe PT, Mitsiadis TA, Ornoy A, Blumenfeld A, Deutsch D. Amelogenin in cranio-facial development: the tooth as a model to study the role of amelogenin during embryogenesis. *J Exp Zool B Mol Dev Evol* 2009, 312 B (5):445–457
- Gupta A, Mo YY. Detection of microRNAs in cultured cells and paraffin-embedded tissue specimens by in situ hybridization. *Methods Mol Biol*. 2011;676:73-83
- Gundberg CM, Nishimoto SK. Vitamin K dependent proteins of bone and cartilage. 2006. *Dynamics of Bone and Cartilage Metabolism*. San Diego: Academic Press. pp. 55–70
- Habelitz S, Denbesten PK, Marshall SJ, Marshall GW, Li W. Amelogenin control over apatite crystal growth is affected by the pH and degree of ionic saturation. *Orthod Craniofac Res*. 2005 8(4):232-8.
- Hall RC, Embery G, Lloyd D. Immunochemical localization of the small leucine-rich proteoglycan lumican in human predentine and dentine. *Arch Oral Biol*. 1997; 42(10-11):783-6.
- Hao J, Ramachandran A, George A. Temporal and spatial localization of the dentin matrix proteins during dentin biomineralization. *J Histochem Cytochem*. 2009; 57(3):227-37
- Harada, S., Rodan, G. A. Control of osteoblast function and regulation of bone mass. *Nature*, 2003. 423, 349-55.
- Hart, T.C., Hart, P.S., Gorry, M.C., Michalec, M.D., Ryu, O.H., Uygur, C., Ozdemir, D., Firatli, S., Aren, G., Firatli, E. Novel ENAM mutation responsible for autosomal recessive amelogenesis imperfecta and localised enamel defects. *J Med Genet* 2003;40, 900-6.
- Hasegawa, N., Kawaguchi, H., Ogawa, T., Uchida, T., Kurihara, H. Immunohistochemical characteristics of epithelial cell rests of Malassez during cementum repair. *J Periodontal Res* . 2003, 38 51-6.

- Hassan MQ, Gordon JA, Beloti MM, Croce CM, van Wijnen AJ, Stein JL, Stein GS, Lian JB. A network connecting Runx2, SATB2, and the miR-23a~27a~24-2 cluster regulates the osteoblast differentiation program. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010; 107(46):19879-84
- Hatakeyama J, Philp D, Hatakeyama Y, Haruyama N, Shum L, Aragon MA, Yuan Z, Gibson CW, Sreenath T, Kleinman HK, Kulkarni AB. Amelogenin-mediated regulation of osteoclastogenesis, and periodontal cell proliferation and migration. *J Dent Res*. 2006;85(2):144-9.
- Hatakeyama J, Fukumoto S, Nakamura N, Haruyama N, Suzuki S, Hatakeyama Y, Shum L, Gibson C, Yamada Y, Kulkarni A.B. Synergistic roles amelogenin and ameloblastin. *J Dent Res*. 2009, 88(4): 318-322.
- Hauschka PV, Lian JB, Cole DE, Gundberg CM. Osteocalcin and matrix Gla protein: vitamin K-dependent proteins in bone. *Physiol. Rev*. 1989, 69:990–1047
- Haze A, Taylor AL, Blumenfeld A, Rosenfeld E, Leiser Y, Dafni L, Shay B, Gruenbaum-Cohen Y, Fermon E, Haegewald S, Bernimoulin JP, Deutsch D. Amelogenin expression in long bone and cartilage cells and in bone marrow progenitor cells. *Anat Rec*. 2007 (Hoboken); 290 (5):455-6
- Haze A, Taylor AL, Haegewald S, Leiser Y, Shay B, Rosenfeld E, Gruenbaum-Cohen Y, Dafni L, Zimmermann B, Heikinheimo K, Gibson CW, Fisher LW, Young MF, Blumenfeld A, Bernimoulin JP, Deutsch D. Regeneration of bone and periodontal ligament induced by recombinant amelogenin after periodontitis. *J Cell Mol Med*. 2009; 13(6):1110-24
- Heinegard D, Lorenzo P, Saxne T. Noncollagenous proteins; glycoproteins and related proteins *Dynamics of Bone and Cartilage Metabolism*. San Diego: Academic Press 2006, pp. 71–84
- Henry SP, Takanosu M, Boyd TC, Mayne PM, Eberspaecher H. Expression pattern and gene characterization of asporin. A newly discovered member of the leucine-rich repeat protein family. *J. Biol. Chem*. 2001, 276:12212–21
- Hjorten R, Hansen U, Underwood RA, Telfer HE, Fernandes RJ. Type XXVII collagen at the transition of cartilage to bone during skeletogenesis. *Bone* . 2007, 41:535–42
- Hoang QQ, Sicheri F, Howard AJ, Yang DS.. Bone recognition mechanism of porcine osteocalcin from crystal structure. *Nature* 2003, 425:977–80
- Hodgkinson JE, Davidson CL, Beresford J, Sharpe PT. Expression of a human homeobox-containing gene is regulated by 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> in bone cells. *Biochim Biophys Acta*. 1993 18;1174(1):11-6.
- Hoenderop J, Nilius B, Bindels RJ. Calcium Absorption Across Epithelia *Physiol Rev*. 2005, 85: 373–422.
- Holt C, Sensen ES, Clegg RA. Role of calcium phosphate nanoclusters in the control of calcification. *FEBS J*. 2009, 276:2308–23
- Hoshi K, Amizuka N, Oda K, Ikehara Y, Ozawa H Immunolocalization of tissue non-specific alkaline phosphatase in mice. *Histochem Cell Biol* 1997; 107; 183-191
- Hotton D, Davideau JL, Bernaudin JF, Berdal A. In situ hybridization of calbindin-D 28 k transcripts in undecalcified sections of the rat continuously erupting incisor. *Connect Tissue Res*. 1995, 32(1-4):137-43.
- Hotton, D., N. Mauro, F. Lezot, N. Forest, A. Berdal. Differential expression and activity of tissue-nonspecific alkaline phosphatase (TNAP) in rat odontogenic cells in vivo. *J Histochem Cytochem* 1999, 47: 1541-52.
- Hu, C.C., Bartlett, J.D., Zhang, C.H., Qian, Q., Ryu, O.H., Simmer, J.P. Cloning, cDNA sequence, and alternative splicing of porcine amelogenin mRNAs. *J Dent Res* 1996, 75 .1735-41.
- Hu, C.C., Fukae, M., Uchida, T., Qian, Q., Zhang, C.H., Ryu, O.H., Tanabe, T., Yamakoshi, Y., Murakami, C., Dohi, N., Shimizu, M., Simmer, J.P. Cloning and characterization of porcine enamelin mRNAs. *J Dent Res*, 1997a, 76. 1720-9

- Hu, C.C., Fukae, M., Uchida, T., Qian, Q., Zhang, C.H., Ryu, O.H., Tanabe, T., Yamakoshi, Y., Murakami, C., Dohi, N., Shimizu, M., Simmer, J.P. Sheathlin. Ioning, cDNA/polypeptide sequences, and immunolocalization of porcine enamel sheath proteins. *J Dent Res* 1997b, 76. 648-57.
- Hu, C.C., Ryu, O.H., Qian, Q., Zhang, C.H., Simmer, J.P. Cloning, characterization, and heterologous expression of exon-4-containing amelogenin mRNAs. *J Dent Res* 1997c, 76. 641-7
- Hu C.C., Simmer J.P., Bartlett J.D., Qian Q., Zhang C., Ryu O.H., Xue J., Fukae M., Uchida T. MacDougall M. Murine enamelin: cDNA and derived protein sequences. *Connect Tissue Res*, 1998: 39 47-61; discussion 63-7.
- Hu, C.C., Hart, T.C., Dupont, B.R., Chen, J.J., Sun, X., Qian, Q., Zhang, C.H., Jiang, H., Mattern, V.L., Wright, J.T., Simmer, J.P. Cloning human enamelin cDNA, chromosomal localization, and analysis of expression during tooth development. *J Dent Res* 2000: 79. 912-9.
- Hu, J.C., Sun, X., Zhang, C. and Simmer, J.P. A comparison of enamelin and amelogenin expression in developing mouse molars. *Eur J Oral Sci* 2001a; 109. 125-32.
- Hu, J.C., Zhang, C.H., Yang, Y., Karrman-Mardh, C., Forsman-Semb, K., Simmer, J.P.,.: Cloning and characterization of the mouse and human enamelin genes. *J Dent Res* 2001b; 80. 898-902.
- Hu J.C., Yamakoshi Y., Yamakoshi F., Krebsbach P.H., Simmer J.P. Proteomics and genetics of dental enamel. *Cells Tissues Organs* 2005:181. 219-31.
- Hu J.C., Hu Y., Smith C.E., McKee, M.D., Wright J.T., Yamakoshi Y., Papagerakis P., Hunter G.K., Feng J.Q., Yamakoshi F. Simmer J.P: Enamel defects and ameloblast-specific expression in Enam knock-out/lacZ knock-in mice. *J Biol Chem* . 2008, 283 10858-71.
- Hubbard MJ. Calcium Transport Across the Dental Enamel Epithelium *Crit. Rev. Oral Biol. Med.* 2000; 11; 437
- Iacob S, Veis A. Identification of temporal and spatial expression patterns of amelogenin isoforms during mouse molar development. *Eur J Oral Sci.* 2006; 114 Suppl 1:194-200; discussion 201-2, 381.
- Ikawa T., Kakegawa A., Nagano T., Ando H., Yamakoshi Y., Tanabe T., Simmer J.P., Hu C.C., Fukae M., Oida S. Porcine amelogenin is expressed from the X and Y chromosomes. *J Dent Res.* 2005 84 144-8.
- Jande SS, Tolnai S, Lawson DE. Immunohistochemical localization of vitamin D-dependent calcium-binding protein in duodenum, kidney, uterus and cerebellum of chickens. *Histochemistry.* 1981;71(1):99-116
- Janones, D.S., Massa, L.F. and Arana-Chavez, V.E. Immunocytochemical examination of the presence of amelogenin during the root development of rat molars. *Arch Oral Biol* 2005, 50 527-32.
- Jegat, N., Septier, D., Veis, A., Poliard, A., Goldberg, M. Short-term effects of amelogenin gene splice products A+4 and A-4 implanted in the exposed rat molar pulp. *Head Face Med* 2007 3:40.
- Jernvall, J., Thesleff, I. Reiterative signaling and patterning during mammalian tooth morphogenesis. *Mech Dev* 2000, 92 19-29.
- Karsenty, G. Transcriptional control of skeletogenesis. *Annu Rev Genomics Hum Genet.* 2008; 9, 183-96.
- Kawasaki K, Weiss KM. Mineralized tissue and vertebrate evolution: the secretory calcium-binding phosphoprotein gene cluster. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100(7):4060-5.
- Kawasaki K, Buchanan AV, Weiss KM. Biomineralization in humans: making the hard choices in life. *Annu Rev Genet.* 2009;43:119-42.

- Kida M., Sakiyama Y., Matsuda A., Takabayashi S., Ochi H., Sekiguchi H., Minamitake S., Ariga T.: A novel missense mutation (p.P52R) in amelogenin gene causing X-linked amelogenesis imperfecta. *J Dent Res* 2007, 86 ; 69-72.
- Kim YJ, Lee, M.H., Wozney, JM., Cho, JY., Ryoo, HM. Bone morphogenetic protein-2-induced alkaline phosphatase expression is stimulated by Slx5 and repressed by Msx2. *J Biol Chem*, 2004, 279; 50773-80
- Komori T. Regulation of bone development and extracellular matrix protein genes by RunX2. *Cell Tissue Res*. 2010, 339(1):189-95
- Krebsbach, P.H., Lee, S.K., Matsuki, Y., Kozak, C.A., Yamada, K.M., Yamada, Y. Full-length sequence, localization, and chromosomal mapping of ameloblastin. A novel tooth-specific gene. *J Biol Chem*. 1996: 271, 4431-5.
- Kumar R, Singh SK, Koshkin AA, Rajwanshi VK, Meldgaard M, Wengel J. The first analogues of LNA (locked nucleic acids): phosphorothioate-LNA and 2'-thio-LNA. *Bioorg Med Chem Lett*. 1998; 8(16):2219-22
- Lacerda-Pinheiro S, Septier D, Tompkins K, Veis A, Goldberg M, Chardin H. Amelogenin gene splice products A+4 and A-4 implanted in soft tissue determine the reorientation of CD45-positive cells to an osteo-chondrogenic lineage. *J Biomed Mater Res* . 2006;79(4):1015-22.
- Lacerda-Pinheiro S, Marchadier A, Donãs P, Septier D, Benhamou L, Kellermann O, Goldberg M, Poliard A. An In vivo Model for Short-term evaluation of the implantation effects of biomolecules or Stem Cells in the Dental Pulp. *Open Dent J*. 2008; 2:67-72.
- Lacruz RS, Nanci A, Kurtz I, Wright JT, Paine ML. Regulation of pH During Amelogenesis. *Calcif Tissue Int*. 2010, 86(2):91-103.
- Lagerström M, Dahl N, Nakahori Y, Nakagome Y, Bäckman B, Landegren U, Pettersson U. A deletion in the amelogenin gene (AMG) causes X-linked amelogenesis imperfecta (AIH1). *Genomics*. 1991 10(4):971-5
- Lagerstrom-Fermer, M., Nilsson, M., Backman, B., Salido, E., Shapiro, L., Pettersson, U., Landegren, U. Amelogenin signal peptide mutation: correlation between mutations in the amelogenin gene (AMGX) and manifestations of X-linked amelogenesis imperfecta. *Genomics* 1995, 26. 159-62.
- Lamoureux F, Baud'huin M, Duplomb L, Heymann D, Redini F. Proteoglycans: key partners in bone cell biology. *Bioessays* . 2007, 29:758–71
- Lanyon LE. Osteocytes, strain detection, bone modeling and Remodeling. *Calcif Tissue Int*; 1993 53 Suppl 1: S102-106.
- Lattanzi, W., Di Giacomo, M.C., Lenato, G.M., Chimienti, G., Voglino, G., Resta, N., Pepe, G. and Guanti, G. A large interstitial deletion encompassing the amelogenin gene on the short arm of the Y chromosome. *Hum Genet*, 2005:116. 395-401.
- Lau EC, Mohandas TK, Shapiro LJ, Slavkin HC, Snead ML. Human and mouse amelogenin gene loci are on the sex chromosomes. *Genomics* 1989, 4(2):162-8.
- Lau, E.C., Simmer, J.P., Bringas, P., Jr., Hsu, D.D., Hu, C.C., Zeichner-David, M., Thiemann, F., Snead, M.L., Slavkin, H.C., Fincham, A.G.: Alternative splicing of the mouse amelogenin primary RNA transcript contributes to amelogenin heterogeneity. *Biochem Biophys Res Commun*, 1992, 188 1253-60.
- Le TQ, Zhang Y, Li W, Denbesten PK. The effect of LRAP on enamel organ epithelial cell differentiation. *J Dent Res*. 2007 (11):1095-9.
- Lee, J.M., Kang, H.J., Lee, H.R., Choi, C.Y., Jang, W.J., Ahn, J.H. PIAS1 enhances SUMO-1 modification and the transactivation activity of the major immediate-early IE2 protein of human cytomegalovirus. *FEBS Lett* ,2003, 555 322-8.
- Lee, N. K., Karsenty, G., Reciprocal regulation of bone and energy metabolism. *Trends Endocrinol Metab*. 2008, 19, 161-6.

- Lench NJ, Winter GB. Characterisation of molecular defects in X-linked amelogenesis imperfecta (AIH1). *Hum Mutat.* 1995; 5(3):251-9.
- Leucht P, Kim JB, Amasha R, James AW, Girod S, Helms JA. Embryonic origin and Hox status determine progenitor cell fate during adult bone regeneration. *Development.* 2008 ;135(17):2845-54.
- Lezot F., Davideau J.L., Thomas B., Sharpe P., Forest N. and Bernal A.: Epithelial Dlx-2 homeogene expression and cementogenesis. *J Histochem Cytochem*, 2000a, 48. 277-84.
- Lezot, F., Thomas, B., Hotton, D., Forest, N., Orestes-Cardoso, S., Robert, B., Sharpe, P. and Bernal, A.: Biom mineralization, life-time of odontogenic cells and differential expression of the two homeobox genes MSX-1 and DLX-2 in transgenic mice. *J Bone Miner Res*, 2000b, 15. 430-41.
- Lezot F, Thomas B, Greene S R., Hotton D, Yuan ZA, Castaneda B, Bolanos A, Depew, M Sharpe P, Gibson C, Bernal A. Physiological Implications of DLX Homeoproteins in Enamel Formation *J. Cell. Physiol.* 2008, 216: 688–697,
- Lézet F, Thomas BL, Blin-Wakkach C, Castaneda B, Bolanos A, Hotton D, Sharpe PT, Heymann D, Carles GF, Grigoriadis AE, Bernal A. "Dlx homeobox gene family expression in osteoclasts". *J Cell Physiol.* 2010 Jun;223(3):779-87-.
- Li, W., Mathews, C., Gao, C., DenBesten, P.K. Identification of two additional exons at the 3' end of the amelogenin gene. *Arch Oral Biol* 1998, 43; 497-504.
- Li Y, Yuan ZA, Aragon MA, Kulkarni AB, Gibson CW. Comparison of body weight and gene expression in amelogenin null and wild-type mice. *Eur J Oral Sci.* 2006 114 Suppl 1:190-3.
- Linde A, Lussi A. Mineral induction by polyanionic dentin and bone proteins at physiological ionic conditions. *Connect Tissue Res.* 1989;21(1-4):197-202.
- Linde A, Goldberg M. Dentinogenesis. *Crit Rev Oral Biol Med*, 1993, 4 : 679-728.
- Linde A, Lundgren T. From serum to the mineral phase. The role of the odontoblast in calcium transport and mineral formation. *Int J Dev Biol.* 1995; 39(1):213-22
- Lindemeyer RG, Gibson CW, Wright TJ. Amelogenesis imperfecta due to a mutation of the enamelin gene: clinical case with genotype-phenotype correlations. *Pediatr Dent.* 2010;32(1):56-60.
- Linse S, Forsen S Déterminants that govern high-affinity calcium binding. *Adv Second Messenger Phosphoprotein Res*, 1991, 30: 89-151.
- Liu YH., Kundu R., Wu L., Luo W., Ignelzi MA., Snead ML., Maxson RE. Premature suture closure and ectopic cranial bone in mice expressing Msx-2 transgenes in the developing skull. *Proc Natl Acad Sci, USA*, 1995, 92 : 6137-6141.
- Liu Y, Porta A, Peng X, Gengaro K, Cunningham EB, Li H, Dominguez LA, Bellido T, Christakos S. Prevention of glucocorticoid-induced apoptosis in osteocytes and osteoblasts by calbindin-D<sub>28k</sub>. *J Bone Miner Res.* 2004, 19(3):479-90.
- Liu TL, Wang Q, Localization of enamelin in developing rat incisor by immunofluorescence. *Shanghai Kou Qiang Yi Xue.* 2010, 19(4):419-22.
- Lorenzo P, Aspberg A, Onnerfjord P, Bayliss MT, Neame PJ, Heinegard D. Identification and characterization of asporin. a novel member of the leucine-rich repeat protein family closely related to decorin and biglycan. *J Biol Chem*, 2001; 276(15):12201-11.
- Lowenstam HA. Minerals formed by organisms. *Science.* 1981;211(4487):1126-31.



- Lukinmaa PL, Vaahtokari A, Vainio S, Sandberg M, Waltimo J, Thesleff I. Transient expression of type III collagen by odontoblasts: developmental changes in the distribution of pro-alpha 1(III) and pro-alpha 1(I) collagen mRNAs in dental tissues. *Matrix*. 1993;13(6):503-15
- Lundquist P, Lundgren T, Gritli-Linde A, Linde A. Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchanger isoforms of rat odontoblasts and osteoblasts. *Calcif Tissue Int*. 2000 67(1):60-7
- Luo G, D'Souza R, Hogue D, Karsenty G. The matrix Gla protein gene is a marker of the chondrogenesis cell lineage during mouse development. *J. Bone Miner. Res*. 1995.10:325–34
- Lyaruu DM, Bronkers AL, Mulder L, Mardones P, Medina JF, Kellokumpu S, Oude-Elferink RP, Everts V. 2008 The anion exchanger Ae2 is required for enamel maturation in mouse teeth. *Matrix Biol*, 2008;27(2):119-27.
- Lyngstadaas SP, Wohlfahrt JC, Brookes SJ, Paine ML, Snead ML, Reseland JE. Enamel matrix proteins; old molecules. *Orthod Craniofac Res* 2009;12:243–253.
- MacDougall, M., Simmons, D., Gu, T.T., Forsman-Semb, K., Mardh, C.K., Mesbah, M., Forest, N., Krebsbach, P.H., Yamada, Y., Berdal, A. 2000: Cloning, characterization and immunolocalization of human ameloblastin. *Eur J Oral Sci* 108 303-10.
- Magloire H, Joffre A, Azerad J, Lawson DE. Localization of 28 kDa calbindin in human odontoblasts. *Cell Tissue Res*. 1988; 254(2):341-6
- Magloire H, Couble ML, Thivichon-Prince B, Maurin JC, Bleicher F. Odontoblast: a mechano-sensory cell. *J Exp Zool B Mol Dev Evol*. 2009;312B(5):416-24.
- Mardh CK, Bäckman B, Simmons D, Golovleva I, Gu TT, Holmgren G, MacDougall M, Forsman-Semb K. Human ameloblastin gene: genomic organization and mutation analysis in amelogenesis imperfecta patients. *Eur J Oral SciFeb*. 2001;109(1):8-13.
- Margolis H.C, Beniash E, Fowler C.E. Role of macromolecular assembly of enamel matrix proteins in enamel formation. *J Dent Res* 2006, 85(9): 775-793.
- Martineau-Doize B., Warshawsky H., Dickson K., Lai WH., Bergeron JJ. - Localization of epidermal growth factor receptors in cells of the enamel organ of the rat incisor. *Dev Biol*, 1991, 148(2) : 590-601.
- Martinek N, Shahab J, Sodek J, Ringuette M.. Is SPARC an evolutionarily conserved collagen chaperone? *J. Dent. Res*. 2007. 86:296–305
- Matsuo N, Tanaka S, Yoshioka H, Koch M, Gordon MK, Ramirez F.. Collagen XXIV (Col24a1) gene expression is a specific marker of osteoblast differentiation and bone formation. *Connect. Tissue Res*. 2008. 49:68–75
- Masuya H., Shimizu K., Sezutsu H., Sakuraba Y., Nagano J., Shimizu A., Fujimoto N., Kawai A., Miura I., Kaneda H., Kobayashi K., Ishijima J., Maeda T., Gondo Y., Noda T., Wakana S. Shiroishi T.: Enamelin (Enam) is essential for amelogenesis: ENU-induced mouse 238 mutants as models for different clinical subtypes of human amelogenesis imperfecta (AI). *Hum Mol Genet* 2005, 14 575-83
- Matkovits T, Christakos S. Variable in vivo regulation of rat vitamin D-dependent genes (osteopontin, Ca,Mg-adenosine triphosphatase, and 25-hydroxyvitamin D3 24-hydroxylase): implications for differing mechanisms of regulation and involvement of multiple factors. *Endocrinology*. 1995;136(9):3971-82.
- Merida-Velasco, J.A., Sanchez-Montesinos, I., Espin-Ferra, J., Garcia-Garcia, J.D., Roldan-Schilling, V.: Developmental differences in the ossification process of the human corpus and ramus mandibulae. *Anat Rec* (1993) 235, 319-24.
- Mia D, Scutt A. Histochemical localization of alkaline phosphatase activity in decalcified bone and cartilage. *J Histochem Cytochem*, 2002; 50: 333-340

- Millan JL, Narisawa S, Lemire I, Enzyme replacement therapy for murine hypophosphatasia. *J Bone Miner Res* 2008; 23; 777-787.
- Mizuno, N., Shiba, H., Mouri, Y., Xu, W., Kudoh, S., Kawaguchi, H., Kurihara, H.: *Characterization of epithelial cells derived from periodontal ligament by gene expression patterns of bone-related and enamel proteins*. *Cell Biol Int* 2005; 29 111-7.
- Modder, U. I., Khosla, S., Skeletal stem/osteoprogenitor cells: current concepts, alternate hypotheses, and relationship to the bone remodeling compartment. *J Cell Biochem*. 2008, 103, 393-400.
- Molla M, Descroix V, Aïoub M, Simon S, Castañeda B, Hotton D, Bolaños A, Simon Y, Lezot F, Goubin G, Berdal A. "Enamel protein regulation and dental and periodontal physiopathology in MSX2 mutant mice." *Am J Pathol*. 2010 177(5):2516-26.
- Moradian-Oldak J., Leung W., Simmer J.P., Zeichner-David M., Fincham, A.G.: Identification of a novel proteinase (ameloprotease-I) responsible for the complete degradation of amelogenin during enamel maturation. *Biochem J* 1996, 318 1015-21.
- Moradian-Oldak, J. Amelogenins: assembly, processing and control of crystal morphology. *Matrix Biol* 2001, 20. 293-305.
- Morsczeck, C. Gene expression of runx2, Osterix, c-fos, DLX-3, DLX-5, and MSX-2 in dental follicle cells during osteogenic differentiation in vitro. *Calcif Tissue Int*, 2006;78. 98-102.
- Mothe AJ, Brown IR.. Differential mRNA expression of the related extracellular matrix glycoproteins SC1 and SPARC in the rat embryonic nervous system and skeletal structure. *Brain Res*. 2001, 892:27-41
- Murakami, C., Dohi, N., Fukae, M., Tanabe, T., Yamakoshi, Y., Wakida, K., Satoda, T., Takahashi, O., Shimizu, M., Ryu, O.H., Simmer, J.P., Uchida, T. Immunochemical and immunohistochemical study of the 27- and 29-kDa calcium-binding proteins and related proteins in the porcine tooth germ. *Histochem Cell Biol*, 1997, 107. 485-94.
- Nakahori Y, Takenaka O, Nakagome Y: A human X-Y homologous region encodes "amelogenin". *Genomics*. 1991;9(2):264-9
- Nakamura Y., Slaby I., Spahr A., Pezeshki G., Matsumoto, K., Lyngstadaas, S.P. Ameloblastin fusion protein enhances pulpal healing and dentin formation in porcine teeth. *Calcif Tissue Int* 2006.78 (278-84).
- Smith CE, Nanci A, Denbesten PK. Effects of chronic fluoride exposure on morphometric parameters defining the stages of amelogenesis and ameloblast modulation in rat incisors. *Anat Rec*. 1993; 237(2):243-58.
- Nanci, A., Zalzal, S., Lavoie, P., Kunikata, M., Chen, W., Krebsbach, P.H., Yamada, Y., Hammarstrom, L., Simmer, J.P., Fincham, A.G., Snead, M.L., Smith, C.E. Comparative immunochemical analyses of the developmental expression and distribution of ameloblastin and amelogenin in rat incisors. *J Histochem Cytochem* 1998, 46. 911-34.
- Nemere I, Leathers V, Norman AW. 1,25-Dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>-mediated intestinal calcium transport. Biochemical identification of lysosomes containing calcium and calcium-binding protein (calbindin-D<sub>28k</sub>). *J Biol Chem*. 1986 5; 261(34):16106-14
- Newman B, Gigout LI, Sudre L, Grant ME, Wallis GA. Coordinated expression of matrix Gla-protein is required during endochondral ossification for chondrocyte survival. *J. Cell Biol*. 2001, 154:659-66
- Nie, X. Developmentally regulated expression of MSX1, MSX2 and Fgfs in the developing mouse cranial base. *Angle Orthod* 2006, 76 990-5.
- Noble, B. S. The osteocyte lineage. *Arch Biochem Biophys*. 2008. 473, 106-11.
- Núñez J, Sanz M, Hoz-Rodríguez L, Zeichner-David M, Arzate H. Human cementoblasts express enamel-associated molecules in vitro and in vivo. *J Periodontal Res*. 2010 45(6):809-14

- Oida S, Nagano T, Yamakoshi Y, Ando H, Yamada M, Fukae M. Amelogenin gene expression in porcine odontoblasts. *J Dent Res.* 2002; 81(2):103-8.
- Oka S, Oka K, Xu X, Sasaki T, Bringas P Jr, Chai Y. Cell autonomous requirement for TGF-beta signaling during odontoblast differentiation and dentin matrix formation. *Mech Dev.*2007;124(6):409-15.
- Olsen, B.R., Reginato, A.M. and Wang, W. Bone development. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2000; 16. 191-220.
- Orestes-Cardoso SM, Nefussi JR, Hotton D, Mesbah M, Orestes-Cardoso MD, Robert B, Berdal A. Postnatal Msx1 expression pattern in craniofacial, axial, and appendicular skeleton of transgenic mice from the first week until the second year. *Dev Dyn.* 2001 221(1):1-13
- Ottani V, Martini D, Franchi M, Ruggeri A, Raspanti M. Hierarchical structures in fibrillar collagens. *Micron* 2002; 33:587–96
- Paine ML, Wang HJ, Luo W, Krebsbach PH, Snead ML. A transgenic animal model resembling amelogenesis imperfecta related to ameloblastin overexpression. *J Biol Chem.* 2003; 278(21):19447-52
- Paine ML, Snead ML. Tooth developmental biology: disruptions to enamel-matrix assembly and its impact on biomineralization. *Orthod Craniofac Res.* 2005;8(4):239-51.
- Palmer LC, Newcomb CJ, Kaltz SR, Spoerke ED, Stupp SI. Biomimetic systems for hydroxyapatite mineralization inspired by bone and enamel. *Chem Rev.* 2008;108(11):4754-83
- Papagerakis P, Hotton D, Lezot F, Brookes S, Bonass W, Robinson C, Forest N, Berdal A. Evidence for regulation of amelogenin gene expression by 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> in vivo. *J Cell Biochem.* 1999; 76(2):194-205.
- Papagerakis P, MacDougall M, Berdal A. Differential epithelial and mesenchymal regulation of tooth-specific matrix proteins expression by 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> in vivo. *Connect Tissue Res.* 2002; 43(2-3):372-5.
- Papagerakis P., MacDougall, M., Hotton, D., Bailleul-Forestier, I., Oboeuf, M. and Berdal, A., Expression of amelogenin in odontoblasts.: *Bone* 2003; 32. 228-40.
- Papagerakis P., Ibarra, J.M., Inozentseva, N., DenBesten, P., MacDougall, M. Mouse amelogenin exons 8 and 9: sequence analysis and protein distribution. *J Dent Res* 2005; 84. 613-7.
- Papagerakis P, Hu Y, Ye L, Feng JQ, Simmer JP, Hu JC. Identifying promoter elements necessary for enamelin Tissue-Specific Expression. *Cells Tissues Organs.* 2009; 189(1-4):98-104.
- Parmentier M, Lawson De, Vassart G. Human 27-kDa calbindin complementary DNA sequence. Evolutionary and functional implications. *Eur J Biochem.* 1987;170(1-2):207-15
- Pavlic, A., Petelin, M. and Battelino, T. Phenotype and enamel ultrastructure characteristics in patients with ENAM gene mutations g.13185-13186insAG and 8344delG. *Arch Oral Biol,* 2007; 52. 209-17.
- Pérez A., Picotto G., Carpentieri A, Rivoira M. A, Peralta M., Tolosa N., Talamoni G. Minireview on Regulation of Intestinal Calcium Absorption Emphasis on Molecular Mechanisms of Transcellular Pathway *Digestion,* 2008;77:22–34
- Petersson U, Hultenby K, Wendel M. Identification, distribution and expression of osteoadherin during tooth formation. *Eur J Oral Sci.* 2003 ; 111(2):128-36.
- Pittenger M. F., Mackay A. M., Beck S. C., Jaiswal R. K., Douglas R., Mosca J. D., Moorman M. A., Simonetti D. W., Craig S., Marshak D. R. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science.* 1999 ; 284, 143-7.
- Plumb DA, Dhir V, Mironov A, Ferrara L, Poulson R. Collagen XXVII is developmentally regulated and forms thin fibrillar structures distinct from those of classical vertebrate fibrillar collagens. *J. Biol. Chem.* 2007, 282:12791–95

- Rajpar MH, Koch MJ, Davies RM, Melody KT, Kielty CM, Dixon MJ. Mutation of the signal peptide region of the bicistronic gene DSPP affects translocation to the endoplasmic reticulum and results in defective dentine biomineralization. *Hum Mol Genet.* 2002;11(21):2559-65.
- Ravindranath RMH, Devarajan A, Uchida T. Spatiotemporal Expression of Ameloblastin Isoforms during Murine Tooth Development. *The Journal Of Biological Chemistry*, 2007, Vol. 282, NO. 50, pp. 36370–36376.
- Ren SY, Pasqualetti M, Dierich A, Le Meur M, Rijli FM. A Hoxa2 mutant conditional allele generated by Flp- and Cre-mediated recombination. *Genesis.* 2002, 32(2):105-8.
- Rawlinson SC, McKay IJ, Ghuman M, Wellmann C, Ryan P, Prajaneh S, Zaman G, Hughes FJ, Kingsmill VJ. Adult rat bones maintain distinct regionalized expression of markers associated with their development. *PLoS One.* 2009; 4(12)
- Rentz TJ, Poobalarahi F, Bornstein P, Sage EH, Bradshaw AD.. SPARC regulates processing of procollagen I and collagen fibrillogenesis in dermal fibroblasts. *J. Biol. Chem.* 2007;282:22062–71
- Rey, C. Combes, C. Drouet, and M.J. Glimcher. Bone mineral : update on chemical composition and structure. *Osteoporosis international.* 2009; 12 :2155
- Ritchie, H.H., J.E. Berry, M.J. Somerman, C.T. Hanks, A.L. Bronckers, D. Hotton, P. Papagerakis, A. Berdal, W.T. Butler. Dentin sialoprotein (DSP) transcripts: developmentally-sustained expression in odontoblasts and transient expression in pre-ameloblasts. *Eur J Oral Sci*; 1997,105: 405-13.
- Robinson C., Kirkham J., Brookes SJ., Bonass WA., Shore RC. The chemistry of enamel development. *Int J Dev Biol*, 1995, 39 : 145-152.
- Robinson, C., Brookes, S.J., Shore, R.C., Kirkham, J. The developing enamel matrix: nature and function. *Eur J Oral Sci*; 1998,:106 Suppl 1 282-91.
- Rogers JH. Calretinin: a gene for a novel calcium-binding protein expressed principally in neurons. *J Cell Biol*, 1990, 110(5):1845
- Romanelli M, Dini V, Vowden P, Agren MS. Amelogenin, an extracellular matrix protein, in the treatment of venous leg ulcers and other hard-to-heal wounds: experimental and clinical evidence. *Clin Interv Aging.* 2008;3(2):263-72.
- Roth J., Brown D., Norman A. W., Orci L.: Localization of the vitamin D-Dependent calcium binding protein in mammalian kidney. *Am. J. Physiol.*, 1982, 243, F243-F252.
- Ryoo HM, Hoffmann HM, Beumer T, Frenkel B, Towler DA, Stein GS, Stein JL, van Wijnen AJ, Lian JB. Stage-specific expression of Dlx-5 during osteoblast differentiation: involvement in regulation of osteocalcin gene expression. *Mol Endocrinol.* 1997, 11:1681-94
- Salido, E.C., Yen, P.H., Koprivnikar, K., Yu, L.C., Shapiro, L.J. The human enamel protein gene amelogenin is expressed from both the X and the Y chromosomes. *Am J Hum Genet* 1992, 50 303-16.
- Santagati, F., Rijli, F. M. Cranial neural crest and the building of the vertebrate head. *Nat Rev Neurosci* 2003. 4, 806-18.
- Sasaki, Shimokawa, H. The amelogenin gene. *Int J Dev Biol* ; 1995, 39 : 127-33.
- Satokata, I. and Maas, R. Msx1 deficient mice exhibit cleft palate and abnormalities of craniofacial and tooth development. *Nat Genet*, 1994, 6. 348-56.
- Satokata I., Ma L., Ohshima H., Bei M., Woo I., Nishizawa K., Maeda T., Takano Y., Uchiyama M., Heaney S., Peters H., Tang Z., Maxson R., Maas R. - Msx2 deficiency in mice causes pleiotropic defects in bone growth and ectodermal organ formation. *Nat Genet*, 2000, 24(4) : 391-395.

- Sawada T, Sekiguchi H, Uchida T, Yamashita H, Shintani S, Yanagisawa T. Histological and immunohistochemical analyses of molar tooth germ in enamelin-deficient mouse. *Acta Histochem*. 2010 Jun 30
- Schreiner DS, Jande SS, Parkes CO, Lawson DE, Thomasset. Immunocytochemical demonstration of two vitamin D-dependent calcium-binding proteins in mammalian kidney *Acta Anat* (Basel). 1983;117(1):1-14.
- Schreiner DS, Jande SS, Lawson DE Target cells of vitamin D in the vertebrate retina. *Acta Anat* (Basel). 1985;121(3):153-62.
- Scott JE. Proteoglycan-fibrillar collagen interactions. *Biochem J*. 1988;252(2):313-23.
- Seedorf, H., Klaften, M., Eke, F., Fuchs, H., Seedorf, U. and Hrabe de Angelis, M.: A mutation in the enamelin gene in a mouse model. *J Dent Res*, 2007, 86. 764-8.
- Selvig KA. Current concepts of connective tissue attachment to diseased tooth surfaces. *J Biol Buccale*, 1983, 11(2) : 79-94
- Shimokawa H., Ogata Y., Sasaki S., Sobel M.E., McQuillan C.I., Termine J.D. Young M.F.: Molecular cloning of bovine amelogenin cDNA. *Adv Dent Res*, 1987a, 1 293-7. 246
- Shimokawa H., Sobel M.E., Sasaki M., Termine J.D., Young M.F.: Heterogeneity of amelogenin mRNA in the bovine tooth germ. *J Biol Chem* 1987b, 262. 4042-7.
- Slavkin HC. Molecular determinants during dental morphogenesis and cytodifferentiation: a review. *J Craniofac Genet Dev Biol*. 1991;11(4):338-49.
- Simmer, J.P., Hu, C.C., Lau, E.C., Sarte, P., Slavkin, H.C., Fincham, A.G. Alternative splicing of the mouse amelogenin primary RNA transcript. *Calcif Tissue Int*, 1994: 55 302-10.
- Simmer, J.P. and Hu, J.C.: Expression, structure, and function of enamel proteinases. *Connect Tissue Res*, 2002, 43 441-9.
- Simmer JP, Papagerakis P, Smith CE, Fisher DC, Rountrey AN, Zheng L, Hu JC. Regulation of dental enamel shape and hardness. *J Dent Res*. 2010; 89(10):1024-38.
- Simmons, D., Gu, T.T., Krebsbach, P.H., Yamada, Y. and MacDougall, M. Identification and characterization of a cDNA for mouse ameloblastin. *Connect Tissue Res* 1998, 39 3-12
- Six N, Decup F, Lasfargues JJ, Salih E, Goldberg M. Osteogenic proteins (bone sialoprotein and bone morphogenetic protein-7) and dental pulp mineralization. *J Mater Sci Mater Med*. 2002; 13 (2):225-32.
- Smith Ce., Warshawsky H. Histological and three dimensional organization of the odontogenic organ in the lower incisor of 100 gram rats. *Am J Anat*, 1975a, 142(4) : 403-29.
- Smith Ce., Warshawsky H. Cellular renewal in the enamel organ and the odontoblast layer of the rat incisor as followed by radioautography using 3H-thymidine. *Anat Rec*, 1975b, 183(4) : 523-61.
- Smith CE., Nanci A. Overview of morphological changes in enamel organ cells associated with major events in amelogenesis. *Int J Dev Biol*, 1995, 39 : 153-161.
- Smith C.E. Cellular and chemical events during enamel maturation. *Crit Rev Oral Biol Med*, 1998, 9. 128-61
- Smith CE, Warshawsky H. Quantitative analysis of cell turnover in the enamel organ of the rat incisor. Evidence for ameloblast death immediately after enamel matrix secretion. *Anat Rec*. 1977 Jan; 187(1): 63-98.
- Snead, M.L., Zeichner-David, M., Chandra, T., Robson, K.J., Woo, S.L., Slavkin, H.C. Construction and identification of mouse amelogenin cDNA clones. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1983, 80 7254-8.

- Snead, M.L., Lau, E.C., Zeichner-David, M., Fincham, A.G., Woo, S.L., Slavkin, H.C. : DNA sequence for cloned cDNA for murine amelogenin reveal the amino acid sequence for enamel-specific protein. *Biochem Biophys Res Commun*, 1985, 129: 812-8.
- Snead ML, Luo W, Lau EC, Slavkin HC. Spatial- and temporal-restricted pattern for amelogenin gene expression during mouse molar tooth organogenesis. *Development*. 1988;104(1):77-85
- Snead, M.L.: Amelogenin protein exhibits a modular design: implications for form and function. *Connect Tissue Res* 2003, 44 Suppl 1 47-51.
- Sodek J, Li JJ, Kim RH, Ogata Y, Yamauchi M. Characterization of the bone sialoprotein (BSP) gene promoter. *Connect Tissue Res*. 1996;35(1-4):23-31
- Sodek, J., McKee, M. D., Molecular and cellular biology of alveolar bone. *Periodontol* 2000. 24, 99-126.
- Sommer B, Bickel M, Hofstetter W and Wetterwald A. Expression of matrix proteins during the development of mineralized tissues. *Bone*. 1996; 19 (4): 371-380.
- Sonoda A, Iwamoto T, Nakamura T, Fukumoto E, Yoshizaki K, Yamada A, Arakaki M, Harada H, Nonaka K, Nakamura S, Yamada Y, Fukumoto S. Critical role of heparin binding domains of ameloblastin for dental epithelium cell adhesion and ameloblastoma proliferation. *J Biol Chem*. 2009, 284 (40):27176-84
- Spahr, A., Lyngstadaas, S.P., Slaby, I., Haller, B., Boeckh, C., Tsoulfidou, F. and Hammarstrom, L.: Expression of amelin and trauma-induced dentin formation. *Clin Oral Investig*. 2002. 6, 51-7.
- Spahr, A., Lyngstadaas, S.P., Slaby, I. and Pezeshki, G.: Ameloblastin expression during craniofacial bone formation in rats. *Eur J Oral Sci*, 2006, 114 504-11.
- Speel EJ. Detection and amplification systems for sensitive, multiple-target DNA and RNA in situ hybridization: looking inside cells with a spectrum of colors. *Histochem Cell Biol*. 1999 112(2):89-113.
- Sreenath T, Thyagarajan T, Hall B, Longenecker G, D'Souza R, Hong S, Wright JT, MacDougall M, Sauk J, Kulkarni AB.: Dentin sialophosphoprotein knockout mouse teeth display widened predentin zone and develop defective dentin mineralization similar to human dentinogenesis imperfecta type III. *J Biol Chem*, 2003. 4;278(27):24874-80.
- Stein, G. S., Lian, J. B., van Wijnen, A. J., Stein, J. L., Montecino, M., Javed, A., Zaidi, S. K., Young, D. W., Choi, J. Y., Pockwinse, S. M. Runx2 control of organization, assembly and activity of the regulatory machinery for skeletal gene expression. *Oncogene*. 2004, 23, 4315-29.
- Suzuki S, Sreenath T, Haruyama N, Honeycutt C, Terse A, Cho A, Kohler T, Müller R, Goldberg M, Kulkarni AB. Dentin sialoprotein and dentin phosphoprotein have distinct roles in dentin mineralization *Matrix Biol*. 2009 (4):221-9.
- Szebenyi Dm, Obendorf Sk, Moffat. Pre-formation of the semi-open conformation by the apo-calmodulin C-terminal domain and implications binding IQ-motifs. *Nat Struct Biol*, 1981, 3: 501-4
- Szebenyi DM, Moffat K. The refined structure of vitamin D-dependent calcium binding protein from bovine intestine. Molecular details, ion binding and implication for the structure of other calcium-binding proteins. *J Biol Chem*. 1986. 261: 8761-77.
- Takagi Y, Sasaki S. Histological distribution of phosphophoryn in normal and pathological human dentins. *J Oral Pathol*. 1986 15(9):463-7
- Takagi M, Hishikawa H, Hosokawa Y, Kagami A, Rahemtulla F. Immunohistochemical localization of glycosaminoglycans and proteoglycans in predentin and dentin of rat incisors. *J Histochem Cytochem*. 1990. 38(3):319-24

- Takano Y. Enamel mineralization and the role of ameloblasts in calcium transport. *Connect Tissue Res.* 1995;33(1-3):127-37.
- Takahashi S, Kawashima N, Sakamoto K, Nakata A, Kameda T, Sugiyama T, Katsube K, Suda H. Differentiation of an ameloblast-lineage cell line (ALC) is induced by Sonic hedgehog signaling. *Biochem Biophys Res Commun.* 2007; 353(2):405-11
- Tamburstuen MV, Reseland JE, Spahr A, Brookes SJ, Kvalheim G, Slaby I, Snead ML, Lyngstadaas SP. Ameloblastin expression and putative autoregulation in mesenchymal cells suggest a role in early bone formation and repair. *Eur J Oral Sci.* 2010 ; 118(5):451-
- Tamburstuen MV, Reseland JE, Spahr A, Brookes SJ, Kvalheim G, Slaby I, Snead ML, Lyngstadaas SP. Ameloblastin expression and putative autoregulation in mesenchymal cells suggest a role in early bone formation and repair. *Bone.* 2011 ; 48(2):406-13.
- Tanabe, T., Aoba, T., Moreno, E.C., Fukae, M. and Shimuzu, M. Properties of phosphorylated 32 kd nonamelogenin proteins isolated from porcine secretory enamel. *Calcif Tissue Int* 1990 ; 46 : 205-15.
- Taylor AN, Wasserman RH. Vitamin D<sub>3</sub>-induced calcium-binding protein: partial purification, electrophoretic visualization, and tissue distribution. *Arch Biochem Biophys.* 1967 ; 119(1):536-40
- Taylor AN, Mcintosh JE, Bourdeau JE. Immunocytochemical localization of vitamin D-dependent calcium-binding protein in renal tubules of rabbit, rat, and chick. *Kidney Int.* 1982 ; 21(5):765-73
- Terenghi G, Fallon RA. Techniques and applications of in situ hybridisation. *Curr Top Pathol.* 1990 ; 82 : 289-337
- Termine JD, Kleinman HK, Whitson SW, Conn KM, McGarvey ML, Martin GR.. Osteonectin, a bone-specific protein linking mineral to collagen. *Cell*, 1981, 26:99–105
- Thesleff I, Vaahtokari A, Partanen AM. Regulation of organogenesis. Common molecular mechanisms regulating the development of teeth and other organs. *Int J Dev Biol.* 1995 ; 39(1):35-50.
- Thesleff I, Aberg T. Tooth morphogenesis and the differentiation of ameloblasts. *Ciba Found Symp.* 1997 ; 205 : 3-12.
- Thesleff, I., Mikkola, M. The role of growth factors in tooth development. *Int Rev Cytol* 2002, 217 93-135.
- Thesleff, I. Epithelial-mesenchymal signalling regulating tooth morphogenesis. *J Cell Sci.* 2003, 116, 1647-8.
- Thesleff I, Tummers M. Tooth organogenesis and regeneration. *StemBook [Internet]. Cambridge (MA): Harvard Stem Cell Institute; 2009*
- Thorens B, Roth J, Norman AW, Perrelet A, Orci L. Immunocytochemical localization of the vitamin D-dependent calcium binding protein in chick duodenum. *J Cell Biol.* 1982 ; 94(1):115-22.
- Tian H, Lv P, Ma K, Zhou C, Gao X. Beta-catenin/LEF1 activated enamelin expression in ameloblast-like cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2010;398(3):519-24
- Tompkins K, Veis A. Polypeptides translated from alternatively spliced transcripts of the amelogenin gene, devoid of the exon 6a, b, c region, have specific effects on tooth germ development in culture. *Connect Tissue Res.* 2002; 43(2-3) : 224-31.
- Tompkins, K., Alvares, K., George, A. and Veis, A. Two related low molecular mass polypeptide isoforms of amelogenin have distinct activities in mouse tooth germ differentiation in vitro. *J Bone Miner Res* 2005, 20. 341-9.
- Torres-Quintana, M.A., Gaete, M., Hernandez, M., Farias, M., Lobos, N. Ameloblastin and amelogenin expression in postnatal developing mouse molars. *J Oral Sci,* 2005 ; 47 : 27-34.

- Toyosawa, S., Fujiwara, T., Ooshima, T., Shintani, S., Sato, A., Ogawa, Y., Sobue, S. Ijuhin, N. Cloning and characterization of the human ameloblastin gene. *Gene* 2000 : 256. 1-11.
- Tu Q, Zhang J, Paz J, Wade K, Yang P, Chen J. Haploinsufficiency of Runx2 results in bone formation decrease and different BSP expression pattern changes in two transgenic mouse models. *J Cell Physiol.* 2008 ; 217(1):40-7.
- 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 (2):187-95
- Tye CE, Hunter GK, Goldberg HA. Identification of the type I collagen-binding domain of bone sialoprotein and characterization of the mechanism of interaction. *J. Biol. Chem.* 2005. 280:13487–92
- Uchida, T., Murakami, C., Wakida, K., Dohi, N., Iwai, Y., Simmer, J.P., Fukae, M., Satoda, T. and Takahashi, O. Sheath proteins: synthesis, secretion, degradation and fate in forming enamel. *Eur J Oral Sci* 1998, 106(1) : 308-14.
- Urist, M.R., Nilsson, O., Rasmussen, J., Hirota, W., Lovel, T., Schmalzreid, T. and Finerman, G.A.: Bone regeneration under the influence of bone morphogenetic protein beta tricalcium phosphate composite in skull trephine defects in dogs. *Clin Orthop Relat Res* 1987; 295-304.
- Válóczi A, Hornyik C, Varga N, Burgyán J, Kauppinen S, Havelda Z. Sensitive and specific detection of microRNAs by northern blot analysis using LNA-modified oligonucleotide probes. *Nucleic Acids Res.* 2004;32(22):
- Van Genderen, C., Okamura, R.M., Farinas, I., Quo, R.G., Parslow, T.G., Bruhn, L. and Grosschedl, R. Development of several organs that require inductive epithelial-mesenchymal interactions is impaired in LEF-1-deficient mice. *Genes Dev* 1994 ; 8 : 2691-703.
- Veis, A., Tompkins, K., Alvares, K., Wei, K., Wang, L., Wang, X.S., Brownell, A.G., Jengh, S.M. and Healy, K.E. Specific amelogenin gene splice products have signaling effects on cells in culture and in implants in vivo. *J Biol Chem* 275; 2000: 41263-72.
- Veis, A. Amelogenin gene splice products: potential signaling molecules. *Cell Mol Life Sci* 2003; 60. 38-55
- Verma D, Peltomäki T, Jäger A. Reliability of growth prediction with hand-wrist radiographs. *Eur J Orthod.* 2009 (4):438-42.
- Von der Mark K. Structure, biosynthesis and gene regulation of collagens in cartilage and bone. *Dynamics of Bone and Cartilage Metabolism.* 2006, San Diego: Academic Press. pp. 3–40.
- Waddington RJ, Roberts HC, Sugars RV, Schonherr E. Differential roles for small leucine-rich proteoglycans in bone formation. *Eur. Cell Mater.* 2003 6:12–21
- Wang J, Glimcher MJ, Mah J, Zhou HY, Salih E. Expression of bone microsomal casein kinase II, bone sialoprotein, and osteopontin during the repair of calvarial defects. *Bone.* 1998; 22(6):621-8.
- Warotayanont R, Zhu D, Snead ML, Zhou Y. Leucine-rich amelogenin peptide induces osteogenesis in mouse embryonic stem cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2008; 367(1):1-6
- Warotayanont R, Frenkel B, Snead ML, Zhou Y. Leucine-rich amelogenin peptide induces osteogenesis by activation of the Wnt pathway. *Biochem Biophys Res Commun.* 2009 25;387(3):558-63
- Wasserman RH, Corradino RA. Vitamin D, calcium, and protein synthesis. *Vitam Horm.* 1973;31:43-103.
- Wasserman RH, Brindak ME, Meyer SA, Fullmer CS. Evidence for multiple effects of vitamin D3 on calcium absorption: response of rachitic chicks, with or without partial vitamin D3 repletion, to 1,25-dihydroxyvitamin D3. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1982, 79(24):7939-43



- Waymire KG, Mahuren JD, Jaje JM, Guilarte TR, Coburn SP, MacGregor GR: Mice lacking tissue non-specific alkaline phosphatase die from seizures due to defective metabolism of vitamin B-6. *Nat Genet* 1995; 11: 45-51.
- Wazen R M, Moffatt P, Zalzal S F, Yamada Y , Nanci A.: A mouse model expressing a truncated form of ameloblastin exhibits dental and junctional epithelium defects. *Matrix Biology* 2009 ; 28. 292–303
- Wasserman, R.H., and Taylor, A.N. Vitamin D3- induced calcium binding protein in chick intestinal mucosa. *Science* 1966 ; 152, 791-793.
- Whyte MP. Hypophosphatasia and the role of alkaline phosphatase in skeletal mineralization. *Endocr Rev.* 1994 ; 15(4):439-61.
- Whyte MP: Hypophosphatasia. *In the metabolic and molecular bases of inherited disease*; McGraw, New York 2001 pp 5313-5329
- Wienholds E, Kloosterman WP, Miska E, Alvarez-Saavedra E, Berezikov E, de Bruijn E, Horvitz HR, Kauppinen S MicroRNA expression in zebrafish embryonic development. Plasterk RH. *Science.* 2005 ; 309(5732):310-1
- Wiesmann HP, Meyer U, Plate U, Hohling HJ. Aspects of collagen mineralization in hard tissue formation. *Int. Rev. Cytol.* 2005 ; 242:121–56
- Wilkie AO., Tang Z., Elanko N., Walsh S., Twigg SR., Hurst JA., Wall SA., Chrzanowska KH., Maxson RE. Functional haploinsufficiency of the human homeobox gene MSX2 causes defects in skull ossification. *Nat Genet*, 2000, 24(4) : 387-390
- Winograd J., Reilly MP., Roe R., Lutz J., Laughner E., Xu X. Hu L., Asakura T., Vander kolk C., Strandberg JD., Semenza GL. Perinatal lethality and multiple craniofacial malformations in MSX-2 transgenic mice. *Hum Mol Genet*, 1997, 6 : 369-379.
- Wright J.T., Hart P.S., Aldred M.J., Seow K., Crawford P.J., Hong,S.P., Gibson,C.W.,Hart T.C. Relationship of phenotype and genotype in X-linked amelogenesis imperfecta. *Connect Tissue Res* 2003; 44(1) :72-8.
- Wright, J.T.: The molecular etiologies and associated phenotypes of amelogenesis imperfecta. *Am J Med Genet* 2006; 140 2547-55
- Wurtz, T., Berdal, A. Osteoblast precursors at different anatomic sites. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr.* 2003 ; 13, 147-61.
- Xiao S, Yu C, Chou X, Yuan W, Wang Y, Bu L. Dentinogenesis imperfecta 1 with or without progressive hearing loss is associated with distinct mutations in DSPP. *Nat Genet* 2001; 27:201-204.
- Yamakoshi, Y., Pinheiro, F.H., Tanabe, T., Fukae, M. and Shimizu, M Sites of asparagine-linked oligosaccharides in porcine 32 kDa enamelin. *Connect Tissue Res* 1998 ; 39 39-46
- Yamakoshi, Y., Tanabe, T., Oida, S., Hu, C.C., Simmer, J.P.,Fukae, M. Calcium binding of enamel proteins and their derivatives with emphasis on the calcium-binding domain of porcine sheathlin. *Arch Oral Biol*, 2001 ; 46 1005-14.
- Yoshizawa T, Handa Y, Uematsu Y, Takeda S, Sekine K, Yoshihara Y, Kawakami T, Arioka K, Sato H, Uchiyama Y, Masushige S, Fukamizu A, Matsumoto T, Kato S. Mice lacking the vitamin D receptor exhibit impaired bone formation, uterine hypoplasia and growth retardation after weaning. *Nat Genet.* 1997; 16(4):391-6.
- Young WG. Growth hormone and insulin-like growth factor-I in odontogenesis. *Int J Dev Biol*, 1995, 39 : 263-272.
- Yuan, Z.A., Collier, P.M., Rosenbloom, J., Gibson, C.W.: Analysis of amelogenin mRNA during bovine tooth development. *Arch Oral Biol* 1996; 41 205-13.
- Zaki AE, Hand AR, Mednieks MI, Eisenmann DR, Borke JL. Quantitative immunocytochemistry of Ca(2+)-Mg2+ ATPase in ameloblasts associated with enamel secretion and maturation in the rat incisor. *Adv Dent Res.* 1996 ; (2):245-51.

- Zeichner-David M, Diekwish T, Fincham A, Lau E, Maccougall M, Moradian-Oldak J, Simmer J, Snead M, Slavkin Hc.: Control of ameloblast differentiation. *Int J Dev Biol*, 1995; 39 : 69-92
- Zeichner-David, M., Oishi, K., Su, Z., Zakartchenko, V., Chen, L.S., Arzate, H. and Bringas, P., Jr. Role of Hertwig's epithelial root sheath cells in tooth root development. *Dev Dyn*, 2003 ; 228. 651-63.
- Zeichner-David, M., Chen, L.S., Hsu, Z., Reyna, J., Caton, J. and Bringas, P. Amelogenin and ameloblastin show growth-factor like activity in periodontal ligament cells. *Eur J Oral Sci* 2006 ; 114(1) ; 244-53
- Zhou XY, Dempster DW, Marion SL, Pike JW, Haussler MR, Clemens TL. Bone vitamin D-dependent calcium-binding protein is localized in chondrocytes of growth-plate cartilage. *Calcif Tissue Int*. 1986 38(4):244-7
- Zhou YL, Lei Y, Snead ML. Functional antagonism between Msx2 and CCAAT/enhancer-binding protein alpha in regulating the mouse amelogenin gene expression is mediated by protein-protein interaction. *J Biol Chem*, 2000, 275(37):29066-29075.
- Zhou H., S.A. Kim, E.A. Kirk, A.L. Tippens, H. Sun, F. Haeseleer, A. Lee, Ca<sup>2+</sup>-binding protein-1 facilitates and forms a postsynaptic complex with Cav1.2 (L-type) Ca<sup>2+</sup> channels, *J. Neurosci*. 2004, 24 (19) 4698–4708.
- Zhu W, Robey PG, Boskey AL. The regulatory role of matrix proteins in mineralization of bone. In *Osteoporosis*, ed. R Marcus, D Feldman, DA Nelson, CJ Rosen, 2008, pp. 191–240. Boston: Academic Press.

## **IX - ANNEXES**

### **LISTE DES PUBLICATIONS DE L'AUTEUR**

- Bolanos A, **Hotton D**, Lézot F, Ferbus D, De la Dure-Molla M, Berdal A, Babajko S. Regulation of calbindine-D 28K expression by Msx2 in dental cells Journal of Dental Research, 2011 (*article en revision*).
- Molla M, Descroix V, Aïoub M, Simon S, Castañeda B, **Hotton D**, Bolaños A, Simon Y, Lézot F, Goubin G, Berdal A. Enamel protein regulation and dental and periodontal physiopathology in MSX2 mutant mice. Am J Pathol. 2010 Nov;177(5):2516-26..
- Lézot F, Thomas BL, Blin-Wakkach C, Castaneda B, Bolanos A, **Hotton D**, Sharpe PT, Heymann D, Carles GF, Grigoriadis AE, Berdal A. Dlx homeobox gene family expression in osteoclasts. J Cell Physiol. 2010 Jun;223(3):779-87.
- Petit S, Meary F, Pibouin L, Jeanny JC, Fernandes I, Poliard A, **Hotton D**, Berdal A, Babajko S. Autoregulatory loop of Msx1 expression involving its antisense transcripts. J Cell Physiol. 2009 Aug;220(2):303-10.
- Ruhin-Poncet B, Ghoul-Mazgar S, **Hotton D**, Capron F, Jaafoura MH, Goubin G, Berdal A. Msx and dlx homeogene expression in epithelial odontogenic tumors. J Histochem Cytochem. 2009 Jan;57(1):69-78.
- Berdal A, Molla M, **Hotton D**, Aïoub M, Lézot F, Néfussi JR, Goubin G. Differential impact of MSX1 and MSX2 homeogenes on mouse maxillofacial skeleton. Cells Tissues Organs. 2009;189(1-4):126-32..
- Lézot F, Thomas B, Greene SR, **Hotton D**, Yuan ZA, Castaneda B, Bolaños A, Depew M, Sharpe P, Gibson CW, Berdal A. Physiological implications of DLX homeoproteins in enamel formation. J Cell Physiol. 2008 Sep;216(3):688-97.
- Lézot F, Descroix V, **Hotton D**, Mauro N, Kato S, Berdal A. Vitamin D and tissue non-specific alkaline phosphatase in dental cells. Eur J Oral Sci. 2006 May;114 Suppl 1:178-82; discussion 201-2, 381.
- Ghoul-Mazgar S, **Hotton D**, Lézot F, Blin-Wakkach C, Asselin A, Sautier JM, Berdal A. Expression pattern of Dlx3 during cell differentiation in mineralized tissues. Bone. 2005 Dec;37(6):799-809.
- Teillaud C, Nemere I, Boukhobza F, Mathiot C, Conan N, Oboeuf M, Hotton D, Macdougall M, Berdal A. Modulation of 1alpha,25-dihydroxyvitamin D3-membrane associated, rapid response steroid binding protein expression in mouse odontoblasts by 1alpha,25-(OH)2D3. J Cell Biochem. 2005 Jan 1;94(1):139-52.
- Vi-Fane B, Nefussi JR, Orestes-Cardoso S, **Hotton D**, Robert B, Chabre C, Berdal A, Davideau JL. Genetic and experimental approach to bony craniofacial growth: the role of the divergent homeobox gene Msx1. Orthod Fr. 2003 Mar;74(1):103-13.
- Lézot F, Coudert A, Petit S, Vi-Fane B, **Hotton D**, Davideau JL, Kato S, Descroix V, Pibouin L, Berdal A. Does Vitamin D play a role on Msx1 homeoprotein expression involving an endogenous antisense mRNA? J Steroid Biochem Mol Biol. 2004 May;89-90(1-5):413-7.

Papagerakis P, MacDougall M, Hotton D, Bailleul-Forestier I, Oboeuf M, Berdal A. Expression of amelogenin in odontoblasts. *Bone*. 2003 Mar;32(3):228-40.

Lézot F, Descroix V, Mesbah M, **Hotton D**, Blin C, Papagerakis P, Mauro N, Kato S, MacDougall M, Sharpe P, Berdal A. Cross-talk between Msx/Dlx homeobox genes and vitamin D during tooth mineralization. *Connect Tissue Res*. 2002;43(2-3):509-14.

Berdal A, Lézot F, Pibouin L, **Hotton D**, Ghoul-Mazgar S, Teillaud C, Robert B, MacDougall M, Blin C. Msx1 homeogene antisense mRNA in mouse dental and bone cells. *Connect Tissue Res*. 2002;43(2-3):148-52.

Blin-Wakkach C, Lézot F, Ghoul-Mazgar S, **Hotton D**, Monteiro S, Teillaud C, Pibouin L, Orestes-Cardoso S, Papagerakis P, Macdougall M, Robert B, Berdal A. Endogenous Msx1 antisense transcript: in vivo and in vitro evidences, structure, and potential involvement in skeleton development in mammals. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001 Jun 19;98(13):7336-41.

Orestes-Cardoso SM, Nefussi JR, **Hotton D**, Mesbah M, Orestes-Cardoso MD, Robert B, Berdal A. Postnatal Msx1 expression pattern in craniofacial, axial, and appendicular skeleton of transgenic mice from the first week until the second year. *Dev Dyn*. 2001 May;221(1):1-13.

Lézot F, Thomas B, **Hotton D**, Forest N, Orestes-Cardoso S, Robert B, Sharpe P, Berdal A. Biomineralization, life-time of odontogenic cells and differential expression of the two homeobox genes MSX-1 and DLX-2 in transgenic mice. *J Bone Miner Res*. 2000 Mar;15(3):430-41.

Papagerakis P, **Hotton D**, Lezot F, Brookes S, Bonass W, Robinson C, Forest N, Berdal A. Evidence for regulation of amelogenin gene expression by 1,25-dihydroxyvitamin D(3) in vivo. *J Cell Biochem*. 1999 Dec;76(2):194-205.

Davideau JL, Demri P, **Hotton D**, Gu TT, MacDougall M, Sharpe P, Forest N, Berdal A. Comparative study of MSX-2, DLX-5, and DLX-7 gene expression during early human tooth development. *Pediatr Res*. 1999 Dec;46(6):650-6.

**Hotton D**, Mauro N, Lézot F, Forest N, Berdal A. Differential expression and activity of tissue-nonspecific alkaline phosphatase (TNAP) in rat odontogenic cells in vivo. *J Histochem Cytochem*. 1999 Dec;47(12):1541-52.

Papagerakis P, Peuchmaur M, **Hotton D**, Ferkdadji L, Delmas P, Sasaki S, Tagaki T, Berdal A. Aberrant gene expression in epithelial cells of mixed odontogenic tumors. *J Dent Res*. 1999 Jan;78(1):20-30.

Ritchie HH, Berry JE, Somerman MJ, Hanks CT, Bronckers AL, **Hotton D**, Papagerakis P, Berdal A, Butler WT. Dentin sialoprotein (DSP) transcripts: developmentally-sustained expression in odontoblasts and transient expression in pre-ameloblasts. *Eur J Oral Sci*. 1997 Oct;105(5 Pt 1):405-13.

Davideau JL, Papagerakis P, **Hotton D**, Lézot F, Berdal A. In situ investigation of vitamin D receptor, alkaline phosphatase, and osteocalcin gene expression in oro-facial mineralized tissues. *Endocrinology*. 1996 Aug;137(8):3577-85.

Berdal A, **Hotton D**, Saffar JL, Thomasset M, Nanci A. Calbindin-D9k and calbindin-D28k expression in rat mineralized tissues in vivo. *J Bone Miner Res.* 1996 Jun;11(6):768-79.

Berdal A, Papagerakis P, **Hotton D**, Bailleul-Forestier I, Davideau JL. Ameloblasts and odontoblasts, target-cells for 1,25-dihydroxyvitamin D3: a review. *Int J Dev Biol.* 1995 Feb;39(1):257-62.

**Hotton D**, Davideau JL, Bernaudin JF, Berdal A. In situ hybridization of calbindin-D 28 k transcripts in undecalcified sections of the rat continuously erupting incisor. *Connect Tissue Res.* 1995;32(1-4):137-43.

Davideau JL, Celio MR, **Hotton D**, Berdal A. Developmental pattern and subcellular localization of parvalbumin in the rat tooth germ. *Arch Oral Biol.* 1993 Aug;38(8):707-15.

Berdal A, **Hotton D**, Pike JW, Mathieu H, Dupret JM. Cell- and stage-specific expression of vitamin D receptor and calbindin genes in rat incisor: regulation by 1,25-dihydroxyvitamin D3. *Dev Biol.* 1993 Jan;155(1):172-9.

Berdal A, Gorter de Vries I, **Hotton D**, Cuisinier-Gleizes P, Mathieu H. The cellular and extracellular distribution of osteocalcin and dentin phosphoprotein in teeth of vitamin D-deficient rats. *J Biol Buccale.* 1991 Mar;19(1):45-53.

Balmain N, **Hotton D**, Cuisinier-Gleizes P, Mathieu H. Immunoreactive calbindin-D9K in bone matrix vesicle. *Histochemistry.* 1991;95(5):459-69.

**Hotton D**, Davideau JL, Dupret JM, Pike JW, Mathieu H, Berdal A. Action of 1,25-dihydroxyvitamin D3 in the tooth germ. Modulations of receptor in the development. *C R Seances Soc Biol Fil.* 1991;185(6):482-90.

Berdal A, **Hotton D**, Kamyab S, Cuisinier-Gleizes P, Mathieu H. Subcellular co-localization and co-variations of two vitamin D-dependent proteins in rat ameloblasts. *Arch Oral Biol.* 1991;36(10):715-25.

Balmain N, **Hotton D**, Cuisinier-Gleizes P, Mathieu H. Immunoreactive calbindin-D9K localization in matrix vesicle-initiated calcification in rat epiphyseal cartilage: an immunoelectron microscope study. *J Bone Miner Res.* 1989 Aug;4(4):565-75.

Berdal A, Balmain N, Brehier A, **Hotton D**, Cuisinier-Gleizes P, Mathieu H. Immunological characterization, developmental pattern and vitamin-D-dependency of calbindin D-28 K in rat teeth ameloblasts. *Differentiation.* 1989 Mar;40(1):27-35.

Berdal A, Balmain N, Thomasset M, Brehier A, **Hotton D**, Cuisinier-Gleizes P, Mathieu H. Calbindins D-9kDa and -28kDa and enamel secretion in vitamin D-deficient and control rats. *Connect Tissue Res.* 1989;22(1-4):165-71.

Balmain N, Berdal A, **Hotton D**, Cuisinier-Gleizes P, Mathieu H. Calbindin-D9K immunolocalization and vitamin D-dependence in the bone of growing and adult rats. *Histochemistry.* 1989;92(5):359-65.

**Diplôme de DOCTORAT : “Analyse phénotypique comparative des cellules dentaires et osseuses”**

---

Le squelette oral est particulier dans l’organisme par la diversité des tissus minéralisés dentaires et osseux qui le compose. La première partie de ce travail porte sur les patrons d’expression d’effecteurs de la biominéralisation (calbindine-D28k, phosphatase alcaline et amélogénine) au cours de l’amélogénèse sur notre modèle de l’incisive à croissance continue de rongeur et avec une série de techniques adaptées à l’étude des tissus minéralisés.

Les résultats montrent que les patrons d’expression de ces effecteurs sont contrôlés de façon singulière dans les cellules dentaires à des phases critiques pour la formation du tissu. Ces données sont accompagnées par des résultats sur les protéines de la matrice extracellulaires spécifiques de chacun des tissus, émail, dentine et os.

La deuxième partie de ce mémoire est basée sur la découverte de niveaux d’expression importants des protéines amélaire dans l’os, par RT qPCR, alors que des études classiques considéraient que l’amélogénine, l’améloblastine et l’énaméline sont spécifiques des tissus dentaires. Nous avons revisité l’expression des protéines de l’émail comparativement dans les tissus minéralisés des maxillaires et du squelette axial. Nos résultats montrent que le tissu osseux des mâchoires se singularise par une expression des protéines de l’émail.

The oral skeleton is particular by the biodiversity of the mineralized tissues by the presence of bones and teeth. The first part of this work concerns the expression patterns of biomineralization effectors (calbindin-D<sub>28k</sub>, alkaline phosphatase, amelogenin) during amelogenesis using our model continuously growing rodent tooth and several adapted technical procedure to the study of mineralized tissues. The results show that the patterns of these effectors are controled by a singular way in the dental cells with critical phases for tissue formation. These data are supported by results on specific proteins of the extracellular matrix of enamel during dentin and bone formation.

The second part of this thesis is based on the finding of high expression levels of the enamel genes in bone by RT qPCR. Amelogenin, ameloblastin and enamelin are traditionally considered specific for dental cells and tissues. We comparatively evaluated the enamel proteins expression in the jaw and the axial skeleton using descriptive immunohistochemistry and in situ hybridization. Our results show that the oral bone tissue is singularised by enamel proteins and RNA expression.

---

Rubrique de classement :

---

Mots clés Français : Amélogénine ; Cellules dentaires ; Cellules osseuses ; Protéines amélaire

Mots clés anglais : Amelogenin ; Dental cells ; Bone cells ; Enamel proteins

---

Laboratoire : Laboratoire Physiopathologie Orale Moléculaire  
UMRS 872 – Equipe 5  
Centre de Recherche des Cordeliers  
15-21 rue de l’Ecole de Médecine  
75006 PARIS