



Rôle du Leucine Rich Amelogenin Peptide dans la formation et la minéralisation de l'émail

Elvire Le Norcy

► To cite this version:

Elvire Le Norcy. Rôle du Leucine Rich Amelogenin Peptide dans la formation et la minéralisation de l'émail. Médecine humaine et pathologie. Université Sorbonne Paris Cité, 2015. Français. NNT : 2015USPCB090 . tel-01535859

HAL Id: tel-01535859

<https://theses.hal.science/tel-01535859>

Submitted on 9 Jun 2017

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.

Université Paris Descartes

Ecole doctorale BioSPC

EA 2496 « Pathologies, imagerie et biothérapies oro-faciales »

Rôle du Leucine Rich Amelogenin Peptide dans la formation et la minéralisation de l'émail

Par Elvire LE NORCY

Thèse de doctorat de Développement

Dirigée par le Professeur Anne POLIARD

Présentée et soutenue publiquement le 07 Décembre 2015

Devant un jury composé de :

Joël GAUTRON, Directeur de Recherche	(Rapporteur)
Jean-Yves SIRE, Directeur de Recherche	(Rapporteur)
Catherine CHAUSSAIN, Professeur de universités – Praticien Hospitalier	(Examineur)
Marc McKEE, Professeur des Universités, Ph.D	(Président du Jury)
Anne POLIARD, Professeur des Universités	(Directrice de Thèse)

LE NORCY (Elvire). Rôle du Leucine Rich Amelogenin Peptide dans la formation et la minéralisation de l'émail. (S.l) : (S.n). 2015.f.162 : 30cm. Thèse de doctorat : Université Paris Descartes 2015.

Discipline : Développement

Résumé (français) :

L'émail dentaire est la couche de tissu externe calcifié recouvrant la couronne de la dent; c'est la structure la plus minéralisée du corps humain. L'émail est synthétisé par l'améloblaste au cours du développement de la dent, mais cette population cellulaire dégénère et régresse totalement lorsque la dent devient fonctionnelle. L'émail mature est donc complètement dépourvu de cellules et de contenu protéique. L'amélogénine, la principale protéine de l'émail a la capacité de s'assembler en structures très organisées de type nanochaînes qui vont guider et réguler les cristaux d'hydroxyapatite de l'émail en formation. Le Leucine Rich Amelogenin Peptide (LRAP) est un produit de l'épissage alternatif du gène de l'amélogénine ; c'est un peptide court (56kDa), composée des séquences actives et N- et C-terminales de la protéine d'amélogénine complète. Dans ce travail, nous avons cherché à comprendre le rôle de LRAP dans l'amélogénèse. Nous avons montré 1) que LRAP présentait les mêmes propriétés d'auto-assemblage que la forme complète d'amélogénine et ses produits de clivage ; 2) que LRAP possédait les mêmes propriétés de régulation des phosphates de calcium que la protéine complète ; et 3) que la conformation de la forme phosphorylée de LRAP était modifiée par une augmentation de la concentration de calcium dans le milieu environnant contrairement à la forme déphosphorylée de LRAP. Dans un second temps, nous avons étudié les propriétés de signalisation du peptide et confirmé nos résultats de minéralisation sur des modèles de culture de cellules de type améloblastique LS8 et ALC *in vitro* et sur un modèle de culture de germe de première molaire de souris *ex vivo*. Nous avons montré que la présence des deux formes de LRAP, active la cinétique de différenciation des cellules LS8 et ALC *in vitro* et favorise la formation de cristaux d'HAP organisés et allongés. Dans les germes en culture, la présence de LRAP(+P) dans un milieu minéralisant permet une augmentation de la densité et du volume de minéral formé alors que dans un milieu standard, il favorise la différenciation des germes. LRAP(-P) entraîne en revanche, la synthèse par les améloblastes sécréteurs de longs et fins cristaux d'HAP bien organisés. Ce travail pourrait ouvrir de nouvelles stratégies de régénération des tissus de l'émail afin de traiter des altérations de la couche d'émail résultant de lésions carieuses à l'aide du LRAP(-P) ou de troubles génétiques comme l'amélogénèse imparfaite en utilisant plutôt le LRAP(+P).

Mots clés (français) :

Amélogénine,
LRAP,
Hydroxyapatite,
Email,
Minéralisation,
Amélogénèse

Title : Role of the Leucine Rich Amelogenin Peptide in enamel formation and mineralization

Abstract :

Tooth enamel is the outer calcified layer covering the crown of the tooth; it is the most mineralized tissue of the human body. Enamel is synthesized by ameloblast during tooth development, but this cell population degenerates and regresses when the tooth becomes fully functional. The mature enamel is completely devoid of cells and protein content. The amelogenin, the main protein of the enamel has the ability to assemble into highly organized nanochains, which will guide and regulate the deposition of hydroxyapatite crystals during enamel formation. The Leucine Rich Amelogenin Peptide (LRAP) is a product of alternative splicing of the amelogenin gene; it is a short peptide (56kDa), composed of the active N- and C-terminal sequences of the complete amelogenin protein. The aim of this work is to understand the role of LRAP in enamel formation. We have shown 1) that LRAP presents the same self-assembling properties as the full-length form of amelogenin and its cleavage products; 2) that LRAP exhibits the same calcium phosphate regulating properties as the full-length protein; and 3) that the conformation of the phosphorylated form of LRAP was modified by increasing concentration of calcium in the surrounding medium unlike the dephosphorylated form of LRAP. In the second part of this work, we have studied the peptide signaling properties and confirmed our mineralization results on ameloblast lineage cell culture models (LS8 and ALC) *in vitro* and on mice first molar germ culture model *ex vivo*. We have shown that the presence of both forms of LRAP activate the kinetic of differentiation of LS8 and ALC cells *in vitro*, and results in the formation of organized elongated HAP crystals. In the germ culture experiments, addition of LRAP(+P) in a mineralizing medium induces an increase in the density and volume of the mineral formed whereas in the standard medium, it promotes differentiation of the germs. LRAP(-P) leads to the synthesis by secretory ameloblasts of well organized long and fine HAP crystals. This work may lead the way toward new strategies for enamel tissue regeneration in order to treat alterations in the enamel layer resulting from carious lesions with the LRAP(-P) or genetic disorders such as amelogenesis imperfecta using LRAP(+P).

Keywords (MeSH):

Amelogenin
LRAP
Hydroxyapatite
Enamel
Mineralization
Amelogenesis

à Martin, Adèle et Aurore

Remerciements

A Madame le Professeur Anne Poliard,

Je vous remercie d'avoir accepté de diriger ce travail, pour votre enseignement, vos conseils et votre bienveillance. Vous m'avez permis de conduire ce travail dans les meilleures conditions possibles et ce malgré un planning chargé et deux grossesses. Soyez assurée de ma reconnaissance et de ma gratitude.

A Monsieur le Professeur Joël Gautron

Je vous remercie d'avoir accepté d'évaluer ce travail, du temps que vous y avez consacré ainsi que de vos remarques et suggestions qui m'ont permis de clarifier mon propos.

A Monsieur le Professeur Jean-Yves Sire

Je vous remercie d'avoir accepté d'avoir accepté d'être rapporteur de ce travail, de la lecture attentive que vous avez portée à mon manuscrit, et des questions et remarques qui m'ont amenées à compléter mon travail.

A Madame le Professeur Catherine Chaussain

Je vous remercie de m'avoir accueillie dans votre laboratoire à mon retour des Etats Unis et d'avoir rendu ce travail possible. Sans les collaborations que vous avez initiées et les financements que vous avez obtenus, rien de tout ceci n'aurait été possible.

A Monsieur le Professeur Marc McKee

Je vous suis très reconnaissante d'avoir accepté de participer à ce jury et du temps que vous y avez consacré. Je vous remercie pour l'intérêt et la critique que vous porterez à ce travail.

A tous les membres de l'EA2496 : Julie et Sandy qui m'ont guidée et aidée durant ces 4 années, Gaël et Jeremy les rois du microCT, Mahéva pour les petites souris, Claire, Annie et Brigitte pour vos bons conseils et Tania pour ta bonne humeur.

A mes collègues thésards : Cédric, Caroline, Soledad, Mayssam : we have done it !; à Benny, Maxime, Anne-Margaux et les autres, la lumière est toujours au bout du tunnel...

A mes collègues et amis dentistes : Sibylle, Tchilalo, Céline, Benjamin, merci pour vos conseils, vos encouragements et votre bienveillance.

A Henry Margolis, qui m'a fait découvrir avec tant de bienveillance et aimer la recherche.

A mes collègues et amis orthodontistes : un grand merci pour votre patience et votre compréhension durant ces années de Thèse. Je suis très reconnaissante des efforts et des aménagements que vous m'avez offerts.

A ma famille et mes amis, cette fois je pense que c'est fini ! Un immense merci pour votre soutien et vos encouragements durant ces longues années. Un merci tout particulier à mes parents dont l'optimisme à toute épreuve m'a été d'une aide précieuse.

Enfin, à Martin, merci est un mot bien faible pour t'exprimer ma reconnaissance pour tes encouragements, ta lucidité, ta présence et nos deux merveilles.

Table des matières

Remerciements	6
Table des matières.....	8
Table des illustrations	11
Index	14
Introduction	18
Chapitre 1 : Formation de la couronne dentaire	21
I. Phase d'initiation.....	21
II. Stade du bourgeon.....	23
III. Stade de cupule ou capuchon	24
IV. Stade de cloche	25
1. L'organe de l'émail	25
2. La membrane basale	26
3. La papille dentaire.....	26
V. Dentinogenèse.....	27
1. Le pré-odontoblaste	27
2. Odontoblaste sécréteur	27
a. La prédentine.....	28
b. La dentine minéralisée.....	28
VI. Amélogénèse	29
1. L'améloblaste pré-sécréteur.....	30
2. L'améloblaste sécréteur.....	32
3. L'améloblaste mature	33
a. Phase de transition.....	34
b. Phase de maturation	34
i. L'améloblaste mature à bordure plissée.....	35
ii. L'améloblaste mature à bordure lisse	35
c. Phase de protection.....	35
Chapitre 2 : l'émail	36
I. Les protéines amélaire.....	36
1. L'amélogénine	36
a. Rôle morphogénique	38
b. Rôle de signalisation	40
2. Leucine Rich Amelogenin Peptide (LRAP).....	41
a. Rôle de signalisation.....	41
b. Rôle morphogénique.....	42
3. Dégradation enzymatique de l'amélogénine	42
a. MMP-20	43
b. KLK-4	44
4. Protéines non amélogénine.....	45
II. Structure de l'émail.....	46
1. Les cristaux d'émail	48
2. Prisme d'émail et émail interprismatique	49
3. La gaine du prisme.....	51
4. Caractéristiques structurelles et organisationnelles de l'émail	52
a. Stries de Retzius	52
b. Périskymaties.....	53

c. Stries transversales.....	53
d. Bandes de Hunter et Schreger	53
5. Les phosphates de calcium.....	54
a. Composition et phases minérales.....	54
b. Imagerie des apatites.....	57
i. Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FT-IR).....	57
ii. Microscopie électronique à transmission et diffraction électronique.....	59
Chapitre 3 : Résultats	61
I. Projet de recherche : objectifs du travail	61
II. Rôle de l'extrémité N-terminale dans la régulation de la formation du phosphate de calcium <i>in vitro</i>	62
1. Contexte et question posée	62
2. Matériel et méthodes	62
a. Préparation des solutions de protéines et de minéraux.....	62
b. Préparation des échantillons pour les études de minéralisation	63
c. Préparation des échantillons pour le FT-IR.....	64
d. Préparation des échantillons pour le MET	64
3. Résultats et discussion	64
III. Le Leucine Rich Amelogenin Peptide régule la minéralisation <i>in vitro</i>	66
1. Contexte et question posée	66
2. Matériel et méthodes	66
a. Préparation des protéines	66
b. Préparation des solutions de protéine, de minéraux et de tampons	67
c. Analyses par Dynamic Light Scattering (DLS).....	68
i. Principe du DLS.....	68
ii. Préparation des échantillons.....	68
iii. Collecte des données.....	69
d. Préparation des échantillons pour les études de minéralisation	69
e. Analyses par Microscopie Electronique à Transmission (MET)	70
f. Analyses par Spectroscopie Infrarouge à Transformée de Fourier (FT-IR)	70
g. Analyses statistiques.....	70
3. Résultats et discussion	71
IV. Rôle de la phosphorylation dans l'interaction du calcium avec LRAP.....	73
1. Contexte et question posée	73
2. Matériel et méthodes	73
a. Préparation des solutions de protéines et de minéraux.....	73
b. Diffusion des rayons X aux petits angles (SAXS).....	74
i. Principe	74
ii. Préparation des échantillons.....	74
3. Résultats et discussion	75
V. Rôle de LRAP dans la formation et la minéralisation de l'émail	77
1. Contexte et question posée	77
2. Matériel et méthodes	77
a. Préparation des peptides de LRAP.....	77
b. Expériences de culture cellulaire	78
i. Cellules LS8.....	78
ii. Cellules NIH3T3.....	78
iii. Cellules ALC	78
iv. Analyse de la différenciation cellulaire.....	79
v. Coloration au Rouge Alizarine.....	80
vi. Analyses du minéral en MET	80
c. Expériences de culture de germes.....	80
i. Conditions de culture	80
ii. Extraction des ARN et PCR quantitative.....	81
iii. Analyse par microCT.....	81
iv. Analyse par FE-SEM	82
3. Résultats	82

a.	Effets des peptides de LRAP sur la différenciation des améloblastes.....	82
i.	Analyse par PCR quantitative	82
ii.	Analyse par immunofluorescence	83
b.	Effets des peptides LRAP sur la minéralisation des améloblastes.....	84
i.	Validation du modèle de minéralisation.....	84
ii.	Analyse du minéral formé par les cellules LS8 et ALC.....	85
c.	Effets des peptides LRAP sur la croissance et la différenciation du germe de molaire en culture.....	90
i.	Validation du modèle de culture (histologie)	90
ii.	Analyse par PCR quantitative.....	91
d.	Effets des peptides LRAP sur la minéralisation du germe	93
i.	Analyse par microCT	93
ii.	Analyse par FE-SEM.....	95
iii.	Difficultés rencontrées.....	96
4.	Discussion et conclusion.....	97
Conclusion et Perspectives		100
Bibliographie		106
Communications orales et affichées		117
Annexe		119

Table des illustrations

<i>Figure 1. Coupe sagittale d'une tête d'embryon.....</i>	<i>21</i>
<i>Figure 2. Section coronaire de la partie antérieure de la face en développement – développement de la lame vestibulaire et de la lame dentaire.....</i>	<i>22</i>
<i>Figure 3. Présentation schématique des réseaux de signalisation permettant la médiation des interactions séquentielles et réciproques entre l'épithélium dentaire et le mésenchyme.</i>	<i>23</i>
<i>Figure 4. Histomorphogenèse de la première molaire mandibulaire de souris.</i>	<i>24</i>
<i>Figure 5. Les différents stades de différenciation des cellules de l'épithélium dentaire interne.....</i>	<i>30</i>
<i>Figure 6. Images de MET de l'émail synthétisé par l'améloblaste pré-sécréteur</i>	<i>32</i>
<i>Figure 7. Evolution des améloblastes au cours de la formation de l'émail</i>	<i>33</i>
<i>Figure 8. Vues en MEB d'incisives fracturées de souris WT et KO de 16 semaines</i>	<i>37</i>
<i>Figure 9. Gène de l'amélogénine chez le mammifère.....</i>	<i>37</i>
<i>Figure 10. Séquence en acides aminés de l'amélogénine chez les amniotes.....</i>	<i>38</i>
<i>Figure 11. Représentation schématique de l'assemblage séquentiel de l'amélogénine.....</i>	<i>39</i>
<i>Figure 12. Mécanisme proposé pour l'organisation in vitro de microstructures d'HAP</i>	<i>40</i>
<i>Figure 13. Séquence en acides aminés des formes porcines d'amélogénine complète (P173) et LRAP (P56)....</i>	<i>41</i>
<i>Figure 14. Isoformes de l'amélogénine porcine et produits de clivage</i>	<i>43</i>
<i>Figure 15. Vues en MEB de molaire et d'incisive de souris KO pour Klk4 de 7 semaines.</i>	<i>44</i>
<i>Figure 16. Coupe transversale des prolongements de Tomes entourés d'émail interprismatique.</i>	<i>47</i>
<i>Figure 17. Les couches initiales et finale d'émail sont aprismatiques.....</i>	<i>47</i>
<i>Figure 18. Vues en microscopie électronique à transmission de prismes d'émail entourés d'émail interprismatique dans l'émail de rongeur en formation à un stade précoce et tardif.....</i>	<i>48</i>
<i>Figure 19. Coupes transversales de cristaux d'émail récemment formés au cours du stade de sécrétion ou plus ancien au cours du stade de maturation.....</i>	<i>48</i>
<i>Figure 20. Représentation schématique d'un bloc d'émail en développement et ses rapports à l'améloblaste...49</i>	
<i>Figure 21. Illustration schématique de la structure de l'émail</i>	<i>50</i>
<i>Figure 22. Images en microscopie à balayage présentant les différents aspects de l'émail d'incisive de rat.</i>	<i>51</i>
<i>Figure 23. Coupe longitudinale montrant la disposition des stries Retzius.....</i>	<i>52</i>
<i>Figure 24. Coupe transversale d'émail humain mordancé.....</i>	<i>52</i>
<i>Figure 25. Reconstruction 2D montrant l'organisation et la périodicité des périkyrmies au niveau de la surface de l'incisive centrale inférieure permanente droite de KB5223</i>	<i>53</i>

<i>Figure 26. Vue en microscopie électronique à balayage d'une coupe tangentielle d'émail montrant le motif circulaire des bandes de Hunter et Schreger le long de l'axe longitudinal de la cuspide</i>	<i>54</i>
<i>Figure 27. Structure du phosphate de calcium amorphe.....</i>	<i>55</i>
<i>Figure 28. Structure morphologique d'un cristal d'hydroxyapatite (avec les indices de Miller) et projection 2D de la face 001 du cristal.....</i>	<i>57</i>
<i>Figure 29. Longueurs d'ondes caractéristiques correspondant aux pics de l'hydroxyapatite.....</i>	<i>58</i>
<i>Figure 30. Spectres caractéristiques de l'ACP par FT-IR puis de sa conversion progressive en HAP</i>	<i>58</i>
<i>Figure 31. Indices de Miller et distances correspondantes pour l'HAP.....</i>	<i>60</i>
<i>Figure 32. Différentes formes d'amélogénine utilisées.....</i>	<i>63</i>
<i>Figure 33. Compositions en acides aminés des différentes formes de LRAP utilisées.....</i>	<i>67</i>
<i>Figure 34. Différentes formes d'amélogénine utilisées.....</i>	<i>74</i>
<i>Figure 35. Cinétique d'expression du gène de l'amélogénine dans les cellules LS8 et ALC</i>	<i>83</i>
<i>Figure 36. Analyse par immunofluorescence de l'expression d'amélogénine par des cellules LS8 cultivées en l'absence (contrôle) et en présence de LRAP(-P).</i>	<i>84</i>
<i>Figure 37. Coloration par rouge alizarine des cultures de cellules LS8 et NIH3T3 après 7 jours en milieu de minéralisation.....</i>	<i>85</i>
<i>Figure 38. Coloration au rouge alizarine des cellules LS8 après 7 jours de culture en milieu minéralisant et des cellules ALC après 14 jours de culture en milieu minéralisant en présence de LRAP(+P), de LRAP(-P) et en l'absence de peptide (contrôle).....</i>	<i>86</i>
<i>Figure 39. Analyses par MET et SAED des phases minérales formées dans les conditions de minéralisation par les cellules LS8 à J7 et ALC à J14 en l'absence (contrôle) et la présence de peptides.....</i>	<i>86</i>
<i>Figure 40. Anneaux de diffraction électroniques du minéral formé par les cellules LS8 et ALC en l'absence (contrôle) et en présence de LRAP(+P) et de LRAP(-P)</i>	<i>87</i>
<i>Figure 41. Mesure de la longueur des cristaux d'HAP synthétisés en l'absence (contrôle) et en présence de LRAP(+P) et de LRAP(-P) par les cellules LS8 et ALC</i>	<i>88</i>
<i>Figure 42. Images par MET et diffractions électroniques (SAED) correspondantes pour les différentes phases minérales formées par les cellules ALC en présence du peptide LRAP(+P).....</i>	<i>89</i>
<i>Figure 43. Coupes histologiques non déminéralisées de germes de première molaire de souris cultivées pendant 2 jours et 5 jours dans le milieu standard</i>	<i>91</i>
<i>Figure 44. Expression du gène de l'amélogénine par les germes de premières molaires en culture</i>	<i>92</i>
<i>Figure 45. Vues macroscopiques des germes à 2 jours et 9 jours de culture en milieu S en l'absence (contrôle) et en présence de LRAP(+P) et LRAP(-P).....</i>	<i>93</i>
<i>Figure 46. Densité et pourcentage de minéral des germes PD1 cultivés dans les milieux S et M et images représentatives sélectionnées de microCT.....</i>	<i>94</i>
<i>Figure 47. Analyses par FE-SEM des germes de premières molaires cultivés dans le milieu M.....</i>	<i>96</i>
<i>Figure 48. Phénotypes associés aux différents gènes impliqués dans l'amélogénèse imparfaite.....</i>	<i>102</i>

Index

Liste des abréviations :

ACP : Amorphous Calcium Phosphate

AMBM : Améloblastine

AMTN : Amélotine

ATPases : Adénosines triphosphatases

Barx : BARX Homeobox

Bmp : Bone morphogenic Protein

DCPD : Dicalcium phosphate di-hydrate

DDW : De-ionized demineralized water

DLS : Dynamic Light Scattering

Dlx : Distal-Less Homeobox

DS : Degré de Sursaturation

DSPP : Dentin sialophosphoprotein

EDE : Epithélium dentaire externe

EDI : Epithélium dentaire interne

ENAM : Enaméline

FE-SEM : Field-emission Scanning electron microscope

FGF : Fibroblast growth factor

FT-IR : Fourier-Transformed-Infrared spectroscopy

HAP : Hydroxyapatite

KLK4 : Kallikrein-Related Peptidase-4

LAMP : Lysosome-associated membrane glycoprotein

Lef : Lymphoid Enhancer-Binding Factor

LRAP : Leucine Rich Amelogenin Peptide

LRAP(-CT) : Forme tronquée des acides aminées de l'extrémité C-terminale du peptide LRAP

LRAP(-P) : Forme déphosphorylée du peptide LRAP

LRAP(+P) : Forme phosphorylée du peptide LRAP

MB : Membrane basale interne

MBE : Membrane basale externe

MEB : Microscope électronique à balayage

mEGF : Mouse epithelial growth factor

MET : Microscope électronique à transmission

microCT : microtomographie à rayons X

MIH : Molar Incisor hypomineralization

MMP : Matrix metalloproteinase

MMP20 : Enamélysine

Msx : Msh Homeobox

NE : Nœud de l'émail primaire

NO : Nitric Oxide

OCP : Octacalcium Phosphate

ODAM : Odontogenic Ameloblast-associated Protein

Pax-9 : Paired Box 9

PBS : Phosphate Buffered Saline

PD : papille dentaire

PFA : Paraformaldéhyde

Pitx : Paired-Like Homeodomain

PTA : Phosphore-tungstic acid

qPCR : Quantitative polymerase Chain Reaction

RE : Réticulum étoilé

REG : Réticulum endoplasmique granulaire

Rg : Rayon de giration

RMN : Résonance magnétique nucléaire

SAED : Small Area Electron Diffraction

SAXS : Small Angle X-ray Scattering

SCCP : Secretory calcium-binding phosphoprotein

SCPPPQ1 : Secretory calcium-binding phosphoprotein proline and glutamine rich 1

SF : Sac folliculaire

Shh : Sonic hedgehog

SI : Stratum intermedium

SVF : Sérum de veau fœtal

TRAP : Tyrosine Rich Amelogenin Peptide

Introduction

Les dents humaines sont des organes servant de multiples fonctions vitales. Elles participent à la manducation, la phonation, la déglutition et à l'esthétique faciale. La dent est composée d'une couronne émergée dans la cavité buccale et d'une racine entourée d'os alvéolaire. L'existence de l'os alvéolaire est sous la dépendance stricte de la dent car il est formé et disparaît avec elle. Ainsi un patient édenté aura un visage réduit dans ses dimensions verticales et antéro-postérieures altérant grandement son esthétique faciale et l'absence de dents compromettra ses capacités masticatoires (et donc son alimentation) et sa phonation. Ces paramètres entraîneront une altération de la santé globale de l'individu ainsi qu'une baisse de l'estime de soi et une marginalisation progressive de la société. C'est pourquoi le maintien d'une bonne dentition est un facteur clé de la santé globale de l'individu.

La couronne dentaire est composée de trois tissus : l'émail qui est le tissu de recouvrement, très minéralisé, il a pour but de protéger la dent et d'assurer la résistance aux forces de mastication. Sous l'émail se trouve la dentine, plus élastique par sa composition moins minéralisée et incluant des fibres de collagène, elle permet une certaine diffusion des forces et contraintes appliquées à l'émail. Et enfin la pulpe dentaire qui se prolonge de la couronne dans les racines et qui assure la vascularisation et l'innervation de la dent.

L'émail dentaire est soumis à de nombreuses agressions et peut être altéré par des agents bactériens (caries dentaires), traumatiques (bruxisme), ou par des défauts au cours de sa formation. Ainsi certaines bactéries présentes dans la cavité buccale vont, en association avec une alimentation sucrée et/ou acide, entraîner la libération d'acides au contact de la surface dentaire ; ces derniers vont peu à peu dissoudre les cristaux d'hydroxyapatite composant l'émail et entraîner la formation d'une lésion blanche (tache de déminéralisation) puis d'une cavité au sein de la couche amélaire, ou bien la dissolution progressive de toute la surface de l'émail chez les patients souffrant de régurgitations acides ou de vomissements réguliers. Ces bactéries s'infiltreront ensuite plus en profondeur dans l'organe dentaire en continuant la dissolution de l'émail jusqu'à atteindre la dentine beaucoup moins minéralisée et résistante et ensuite la pulpe dentaire ; à ce moment, les lésions deviennent très douloureuses et peuvent aboutir, dans les cas extrêmes, à l'avulsion de la dent.

Chez les patients présentant un bruxisme, l'émail sera soumis à des forces occlusales de trop grande amplitude, ce qui aboutira d'abord à la formation de micro-fêlures compromettant les propriétés de résistance mécanique de ce tissu ; puis à une usure des faces occlusales par contacts répétés des surfaces dentaires l'une contre l'autre. Les dents auront une apparence très plate et les patients pourront présenter des troubles de l'articulation temporo-mandibulaire de part la surcharge appliquée aux articulations et l'absence de calage occlusal résultant de l'usure des dents.

Enfin de nombreuses altérations génétiques de l'émail ont également été rapportées. La plus connue est l'amélogénèse imparfaite dans laquelle les dents ont un aspect jaune rugueux caractéristique (aspect de la dentine exposée). Ces dents ne présentent pas ou peu d'émail, suivant la sévérité de l'atteinte, ce qui entraîne leur usure très rapide ainsi que de nombreux épisodes douloureux.

Jusqu'à présent le traitement de choix des lésions de l'émail est le nettoyage de la lésion puis le remplacement du tissu détruit par une résine composite. En effet, l'émail mature est un tissu acellulaire qui ne possède pas de propriétés de réparation ou de régénération. La résine doit cependant être collée à la surface dentaire. Ce procédé nécessite une déminéralisation supplémentaire de la surface amélaire afin de permettre la pénétration de la colle dans la dent et la bonne adhérence émail-résine. Ce joint de collage va s'user dans le temps, ce qui va compromettre l'intégrité de la restauration.

Différentes études se sont intéressées au mécanisme de la formation de l'émail et certaines récemment (Ruan and Moradian-Oldak, 2015), à l'utilisation des protéines de l'émail *in vitro* pour reconstruire ce tissu. Il a été montré que l'amélogénine, la principale protéine de l'émail dentaire permet de guider la formation des cristaux d'hydroxyapatite au cours de la formation de la couche d'émail (amélogénèse). Les amélogénines sont synthétisées *in vivo* sous forme phosphorylée, cependant la majorité des études *in vitro* ont été réalisées avec des formes d'amélogénines déphosphorylées. Or il a été montré que l'unique groupement phosphate de la forme complète d'amélogénine avait un rôle critique dans la régulation de la formation des cristaux d'hydroxyapatite *in vitro* (Chapitre II.1- les protéines amélares).

L'objectif de ce travail est de comprendre le rôle d'un petit peptide d'amélogénine, le Leucine Rich Amelogenin Peptide (LRAP) dans l'amélogénèse. Ce peptide est particulièrement intéressant car il est de petite taille et peut être facilement synthétisé commercialement.

Nous avons donc, dans un premier temps, observé si ce petit peptide présentait les mêmes capacités d'auto-assemblage que son homologue de pleine longueur, si cette capacité était modifiée par l'environnement (pH, concentration de calcium), et si elle était retrouvée pour les différentes variantes du peptide (formes déphosphorylées, clivées de l'extrémité C-terminale). Puis dans un second temps si, de façon similaire à la forme complète d'amélogénine, cette capacité lui conférait également des propriétés morphogéniques sur les cristaux d'hydroxyapatite en formation *in vitro*.

Par ailleurs, il a également été montré que les amélogénines (dont le LRAP) avaient un rôle de molécule de signalisation et que LRAP permettait une activation de la transcription d'amélogénine par l'améloblaste. Nous avons donc voulu, dans un troisième temps, étudier l'effet de LRAP sur la différenciation de l'améloblaste et vérifier dans des modèles biologiques nos observations précédentes sur la minéralisation à l'aide de deux modèles de culture cellulaires correspondant à différents stades de l'amélogénèse et d'un modèle de culture de germes de molaire *ex vivo*.

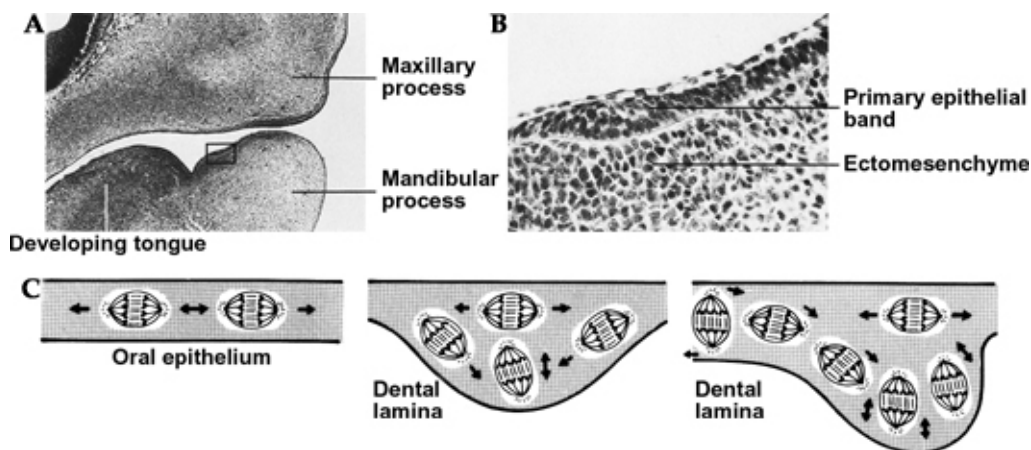
Ce manuscrit est composé dans une première partie d'un rappel sur la formation de la couronne dentaire, puis d'une revue détaillée de la structure et de la composition de l'émail dentaire et enfin dans une troisième partie nous présentons les résultats de nos travaux de recherche et les perspectives envisagées.

Chapitre 1 : Formation de la couronne dentaire

I. Phase d'initiation

L'odontogenèse débute dès la 4^{ème} semaine de développement avec l'arrivée des cellules de la crête neurale au niveau de l'épithélium du premier arc branchial ; puis par des interactions épithélio-mésenchymateuses entre l'épithélium oral et l'ectomésenchyme dentaire (Chai et al., 2000; Miletich and Sharpe, 2004; Rothová et al., 2011). Chez la souris, l'odontogenèse est initiée jusqu'au 12^{ème} jour de développement par des signaux provenant de l'épithélium odontogène du premier arc branchial puis, après ce stade, ce potentiel odontogène est transmis au mésenchyme.

Le premier signe morphologique du développement dentaire est un épaississement local de l'épithélium dû à une prolifération et à un changement d'orientation du fuseau mitotique des cellules en division. Cet épaississement apparaît environ après 37 jours de développement chez l'homme et se forme le long des futurs os maxillaire et mandibulaire au sein de la cavité buccale. L'épithélium oral est alors séparé par une membrane basale de l'ectomésenchyme (Slavkin et al., 1983). Il a la forme d'un fer à cheval et correspond à l'emplacement des futures arcades dentaires ; c'est la lame dentaire (Figure 1).



Copyright © 2003, Mosby, Inc., All rights reserved.

Figure 1. Coupe sagittale d'une tête d'embryon. A. Epaississements de l'épithélium du premier arc branchial. B. Les mêmes structures à plus fort grossissement. C. Changement d'orientation du fuseau mitotique (Nanci, 2003)

La lame dentaire va rapidement s'invaginer et donner la lame vestibulaire externe, qui sera à l'origine du sillon vestibulaire et la lame dentaire interne, qui sera à l'origine de la lame dentaire primaire puis de la lame dentaire secondaire (Figure 2).

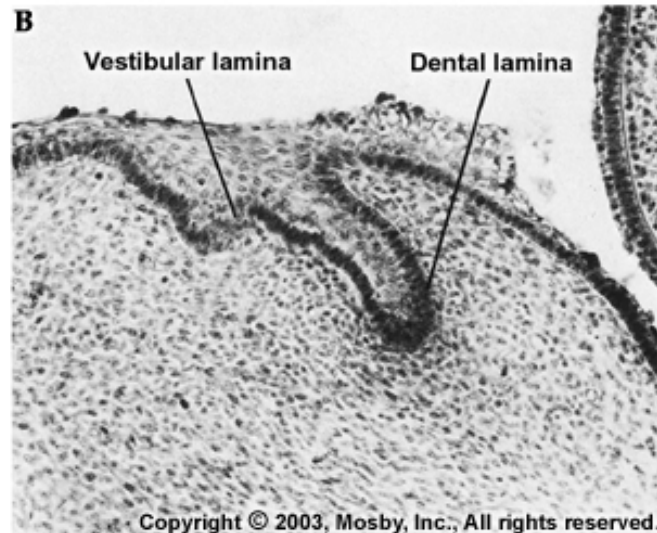


Figure 2. Section coronale de la partie antérieure de la face en développement – développement de la lame vestibulaire et de la lame dentaire (Nanci, 2003)

Les interactions épithélio-mésenchymateuses qui président au développement de la dent ont un contrôle génétique strict. Le modèle de souris a permis d'identifier de nombreux gènes et voies de signalisation qui le sous-tendent et de mieux comprendre leurs rôles respectifs dans cette régulation. Ainsi de nombreux gènes sont exprimés par l'épithélium (ex : Lef-1) et par le mésenchyme (ex : Msx-1, Barx-1) sous le contrôle de facteurs de croissance (ex : FGF8) ou de transcription (ex : Pax-9, Lhx-6,-7) et de protéines sécrétées (ex : Shh).

Les cellules dérivées des crêtes neurales crâniennes possèdent un patron défini d'homéogènes qui spécifie la région du premier arc où les dents vont se former (exemple d'homéogènes : Msx, Dlx, Barx, Lhx, Pitx). Ainsi, Msx-1 et -2 seront retrouvés dans la région incisive, Dlx-1 et -2 et Barx-1 dans la région molaire. Les cellules dérivées des crêtes neurales sont en contact avec l'épithélium oral et sont donc sous l'influence de signaux épithéliaux qui vont activer l'expression de gènes homéobox (Figure 3). (Jussila and Thesleff, 2012; Thesleff and Sharpe, 1997; Tummers and Thesleff, 2009)

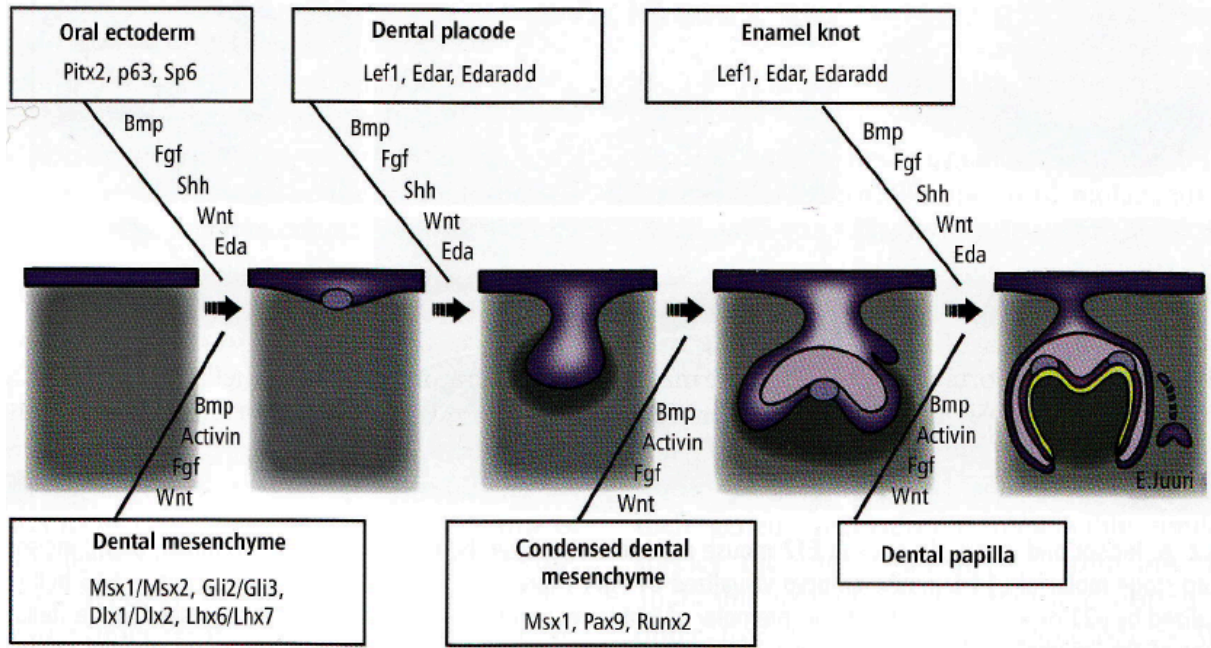


Figure 3. Présentation schématique des réseaux de signalisation permettant la médiation des interactions séquentielles et réciproques entre l'épithélium dentaire et le mésenchyme. Les mêmes molécules de signalisation régulent le développement à tous les stades. Les gènes indiqués dans les boîtes sont nécessaires pour la morphogénèse de la dent normale, comme indiqué par des études de souris knock-out. Des mutations de plusieurs de ces gènes provoquent l'oligodontie chez l'homme. Bmp: protéine osseuse morphogénétique, Fgf: facteur de croissance des fibroblastes, Shh: Sonic Hedgehog et Eda: ectodysplasine (McCauley and Somerman, 2012)

II. Stade du bourgeon

Le stade du bourgeon qui apparaît au début de la 8^{ème} semaine de développement chez l'homme correspond à l'invagination de l'épithélium dans l'ectomésenchyme (Figure 4B). On retrouve deux populations de cellules épithéliales : des cellules allongées au contact de la membrane basale et des cellules arrondies au centre de bourgeon (Lesot and Brook, 2009). Les cellules sous-jacentes de l'ectomésenchyme sont compactes et rassemblées autour du bourgeon épithélial.

Msx-1 et Bmp-4 sont exprimés dans les cellules mésenchymateuses, et l'expression de Bmp-4 est indispensable au maintien de l'expression de Bmp-2 et Shh dans l'épithélium. Le rôle de Shh évolue dans le temps, il est indispensable à la formation du bourgeon dentaire jusqu'à E12 chez la souris puis est nécessaire à l'établissement de la bonne morphologie dentaire à des stades plus tardifs. Pax-9 est également exprimé par les cellules de l'ectomésenchyme et

est nécessaire au développement du germe au delà du stade du bourgeon dentaire (Zhang et al., 2005).

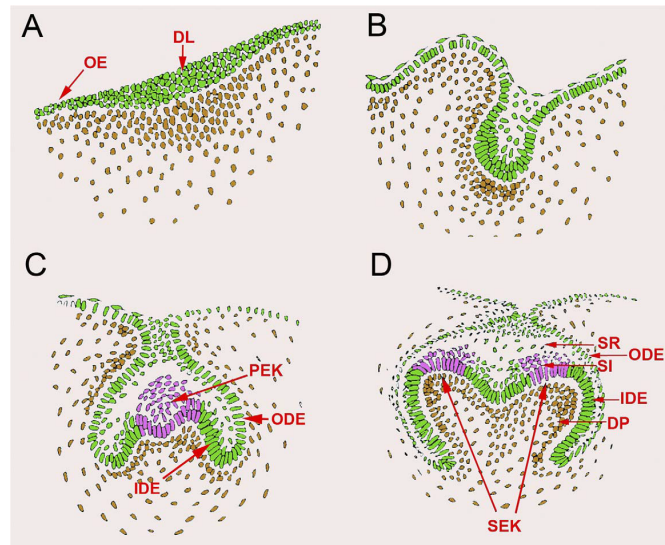


Figure 4. Histomorphogenèse de la première molaire mandibulaire de souris. A, stade de la lame dentaire ; B, stade du bourgeon dentaire ; C, stade de cupule ou de capuchon ; D, stade de la cloche. DL= lame dentaire, OE= épithélium oral, PEK= nœud d'émail primaire, IDE= épithélium dentaire interne, ODE= épithélium dentaire externe, SR : réticulum étoilé, SI= stratum intermedium, DP= papille dentaire, SEK= nœud d'émail secondaire (Lesot and Brook, 2009)

III. Stade de cupule ou capuchon

Le passage du stade de bourgeon à celui de cupule est marqué par l'apparition de différences morphologiques entre les différents types de dents.

Entre les 9^{ème} et 10^{ème} semaines de développement chez l'homme, les cellules du bourgeon épithélial continuent à proliférer dans l'ectomésenchyme (Figure 4C) ; le bourgeon augmente de volume et prend la forme d'un capuchon ou cupule. Le bourgeon épithélial devient l'organe de l'émail et on peut alors distinguer quatre types cellulaires distincts au sein de cet épithélium : en surface, l'épithélium dentaire externe (EDE) puis le réticulum étoilé (RE) et à proximité des cellules mésenchymateuses, l'épithélium dentaire interne (EDI) avec en son centre le nœud de l'émail primaire (NE) (Lesot and Brook, 2009). Ce dernier est un centre de signalisation formé de cellules épithéliales de l'épithélium dentaire interne qui ne prolifèrent plus et qui vont disparaître par apoptose à la fin du stade de cupule. Il pourrait agir comme centre de contrôle de la morphogenèse dentaire entraînant une croissance inégale de

l'épithélium de l'émail et induire, à un stade ultérieur, la formation de nœuds d'émail secondaires situés à l'extrémité des pointes cuspidiennes en formation (Bloch-Zupan et al., 1998; Jernvall et al., 1994, 1998).

L'ectomésenchyme en regard de l'épithélium dentaire interne et du nœud de l'émail devient la papille dentaire (PD) et celui qui entoure la cupule le sac folliculaire (SF).

IV. Stade de cloche

1. L'organe de l'émail

Entre la onzième et la douzième semaine de développement chez l'homme, la croissance continue des différentes populations cellulaires entraîne un approfondissement de la surface inférieure du capuchon épithélial qui confère au germe dentaire une forme de cloche. Durant ce stade, la couronne dentaire acquiert sa forme finale (morphodifférenciation) et les cellules qui fabriqueront les tissus minéralisés de la couronne (améloblastes et odontoblastes) acquièrent un phénotype spécifique (histodifférenciation). On distingue maintenant 4 populations cellulaires au sein de l'organe de l'émail : l'EDE, l'EDI, le SI et au centre le réticulum stellaire ou étoilé (RE) (Figure 4D). Les cellules de l'EDE et de l'EDI se rejoignent au niveau de la zone de réflexion, où les cellules continuent de se diviser jusqu'à ce que la couronne ait atteint sa taille définitive. Les cellules du RE sont caractérisées par une très forte activité de la phosphatase alcaline ainsi qu'un contenu élevé en glycosaminoglycanes. La croissance latérale du germe, accompagnée d'une inflexion en son centre de part et d'autre des nœuds d'émail secondaires, sans activité mitotique, contribuent à l'inflexion de l'EDI et à l'ébauche de la morphogenèse cuspidienne. De plus, les facteurs de croissance produits par les nœuds de l'émail contribuent à la croissance latérale du germe et à l'acquisition de sa forme finale.

A un stade de cloche plus tardif, la cytodifférenciation terminale rend les cellules de l'EDI fonctionnelles ; elles se différencient d'abord en pré-améloblastes puis en améloblastes pré-sécréteurs et enfin en améloblastes sécréteurs qui permettront la mise en place de l'émail. Entre le stade de pré-améloblastes et améloblastes pré-sécréteurs, les cellules perdent leur potentiel de division et deviennent post-mitotiques (Goldberg and Gaucher, 2011; Lesot and Brook, 2009).

2. La membrane basale

Une membrane basale externe (MBE) recouvre l'EDE et le sépare du sac folliculaire. Dans la molaire, des capillaires sanguins sont disposés le long de l'EDE sans pénétrer au sein de l'organe de l'émail sauf lors de la phase de maturation de l'émail où des brèches peuvent apparaître dans la MBE. Les cellules de l'EDE sont reliées à la MBE par des hémidesmosomes et entre elles par des desmosomes et des jonctions lacunaires. Ceci permet des diffusions transmembranaires vers les cellules du RE puis vers les cellules du SI qui vont filtrer les composants à diffuser aux pré-améloblastes puis aux améloblastes sécréteurs.

La membrane basale interne (MB) formée par l'interaction de l'ectoderme oral et du mésenchyme sous-jacent présente deux couches adjacentes : une strate claire aux électrons (lamina lucida) au contact de la membrane cytoplasmique distale des améloblastes ; et une couche plus dense d'aspect granulo-fibrillaire (lamina densa). Immédiatement sous la lamina densa se trouve une zone fibrillaire où s'ancrent les fibrilles de collagène du mésenchyme sous-jacent. Cette MB sépare la couche des améloblastes pré-sécréteurs des pré-odontoblastes. Au stade des améloblastes pré-sécréteurs, la MB va présenter des interruptions ponctuelles de sa surface suite à l'action des MMP produites par les odontoblastes qui leur font face et qui vont faire pénétrer la membrane apicale des améloblastes du côté mésenchymateux dans la matrice extracellulaire dentinaire. La disparition progressive de la MB entraîne une intrication entre l'épithélium et le mésenchyme participant aux propriétés mécaniques de la jonction amélo-dentinaire (Ruch, 1998). La MB, riche en laminine, va jouer un rôle dans l'acquisition de la polarité cellulaire, la prolifération de l'épithélium dentaire et plus généralement dans la morphogenèse dentaire ainsi que dans la différenciation précoce de l'odontoblaste. (Bartlett, 2013; Goldberg and Gaucher, 2011; Piette and Goldberg, 2001)

3. La papille dentaire

L'organe de l'émail enveloppe progressivement la papille dentaire où l'on retrouvera en profondeur la pulpe dentaire embryonnaire et plus en surface, les pré-odontoblastes. Ces cellules dérivées des cellules des crêtes neurales vont subir un nombre déterminé de mitoses (environ 14-15 cycles) puis former deux populations cellulaires (Nanci, 2003):

- les odontoblastes, situés au contact de la MB en regard des améloblastes. Ils vont se polariser et devenir des odontoblastes polarisés sécréteurs et former la dentine.

- Une deuxième population cellulaire, située à distance de la MB, à la surface de la pulpe, les cellules de Höehl. Ce sont des cellules dites « de réserve » qui vont rester indifférenciées mais qui pourront être activées et se différencier en cas de disparition des odontoblastes suite à une lésion. Elles permettront alors la formation de dentine réactionnelle.

V. Dentinogenèse

La dentine est formée par les odontoblastes qui se différencient des cellules de l'ectomésenchyme de la papille dentaire sous l'influence de signaux provenant de l'épithélium dentaire interne (EDI).

La dentinogenèse commence au stade de cloche du développement dentaire dans le tissu papillaire en regard de l'EDI au niveau de pointe cuspidienne en formation. La formation de la dentine continue ensuite le long de la cuspide jusqu'à la boucle cervicale de l'organe de l'émail où la dentine commence à s'épaissir (Nanci, 2003).

1. Le pré-odontoblaste

Au moment du changement de polarité des améloblastes de l'EDI, ces cellules vont délivrer un signal aux cellules ectomésenchymateuses indifférenciées de la papille dentaire adjacente. Ces dernières vont alors s'élargir, et s'allonger pour devenir des pré-odontoblastes.

Cette différenciation cellulaire est sous le contrôle de signaux spécifiques (Figure 3). Les BMP et FGF produits par les cellules de l'EDI vont entraîner l'expression de facteurs de transcription du mésenchyme nécessaires à la dentinogenèse ainsi qu'à la poursuite du développement de l'organe dentaire.

2. Odontoblaste sécréteur

Comme nous l'avons mentionné dans la partie précédente, les pré-odontoblastes vont subir un nombre déterminé de mitoses (environ 14-15 cycles) et former les odontoblastes. Ces cellules présentent un cytoplasme volumineux avec un REG et un appareil de Golgi développés ainsi que de nombreuses mitochondries et vésicules d'exocytose. Elles sont également hautement polarisées avec un noyau situé à l'opposé de l'épithélium dentaire interne.

Les odontoblastes fonctionnels présentent un prolongement cytoplasmique logé dans un tubule dentinaire de la prédentine ; le prolongement odontoblastique et le tubule se poursuivent ensuite dans la dentine où le prolongement forme le front de minéralisation de l'odontoblaste (Ruch, 1998). Dans la pulpe dentaire, les odontoblastes alignés sous la prédentine forment la couche cellulaire odontoblastique.

Ces cellules différenciées ont la capacité de sécréter de la matrice dentinaire au niveau de leur prolongement cytoplasmique. La matrice organique de la prédentine, non encore minéralisée, est composée de collagènes (collagène de type I essentiellement et V), de protéoglycanes (décorine, biglycane, dermatane sulfate, perlecan, kératane sulfate) et de glycoprotéines (Ruch, 1998) ; ainsi que des protéines non collagéniques associées à la minéralisation. Il s'agit de sialoprotéines (ostéonectine, ostéocalcine, ostéopontine, sialoprotéine dentinaire) et de phosphoprotéines comme la phosphoprotéine dentinaire (DPP) et la protéine dentinaire matricielle 1 (DMP1) (Qin C et JQ Feng dans McCauley and Somerman, 2012).

a. La prédentine

La prédentine est la matrice fibrillaire organique de la matrice dentinaire circum-pulpaire avant sa minéralisation en dentine. La prédentine est composée essentiellement de collagène ; elle va se minéraliser progressivement au niveau du front de minéralisation par l'incorporation de différentes protéines non collagéniques. L'épaisseur de prédentine est constante car la quantité de matrice qui se calcifie est compensée par la synthèse d'une proportion équivalente de matrice non minéralisée.

b. La dentine minéralisée

La dentine mature minéralisée est composée d'environ 70% d'HAP, 20% de composés organiques et 10% d'eau. La dentine est plus dure que l'os et le ciment (tissu de recouvrement de la racine) mais moins que l'émail ; cette élasticité est essentielle pour le maintien de l'intégrité de la dent.

La dentine radiculaire diffère légèrement de la dentine coronaire ; en effet, elle présente une orientation différente des fibres de collagène, une quantité inférieure de DPP et un taux d'apposition plus lent.

La dentine formée avant l'édification complète de la dent est appelée dentine primaire, alors que la dentine formée une fois l'odontogenèse terminée est appelée dentine secondaire. La dentine tertiaire est la dentine formée par les odontoblastes en réponse à des stimuli externes (comme l'abrasion dentaire ou les lésions carieuses), sa composition diffère de celle des dentines primaire et secondaire qui sont identiques (Qin C et JQ Feng dans McCauley and Somerman, 2012).

VI. Amélogénèse

L'amélogénèse se divise en deux phases successives. La première phase aboutit à la formation d'un émail partiellement minéralisé (environ 30%) mais d'épaisseur complète. La seconde phase correspond à la dégradation du contenu organique et de l'eau et à son remplacement par du minéral ; ainsi durant cette période les cristaux synthétisés précédemment vont devenir plus larges et plus épais.

L'améloblaste sécrète la matrice protéique et maintient un environnement extracellulaire favorable à la synthèse de minéral. L'améloblaste est une cellule dynamique qui va exister sous 3 principaux stades de différenciation : pré-sécréteur, sécréteur puis mature. A chaque stade de différenciation correspond une activité spécifique (Figure 5).

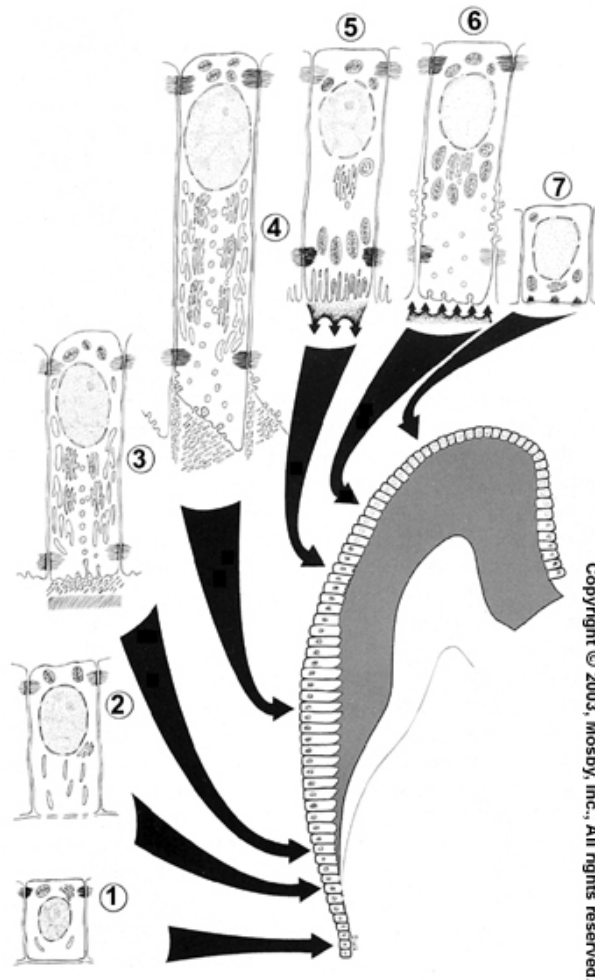


Figure 5. Les différents stades de différenciation des cellules de l'épithélium dentaire interne : 1 – morphogénèse, 2 – histodifférenciation, 3- stade pré-sécréteur, 4 – stade sécréteur, 5 – stade de maturation avec bordure plissée, 6 – stade de maturation avec bordure lisse, 7 – stade de protection. (Nanci, 2003)

1. L'améloblaste pré-sécréteur

Lors de la différenciation des cellules de l'épithélium dentaire interne en améloblastes, les cellules vont s'allonger et leur noyau va migrer en direction du stratum intermedium. Au sein de chaque cellule, le complexe de Golgi ainsi que le réticulum endoplasmique vont augmenter de volume et migrer distalement. Un complexe de jonction va se développer à l'extrémité distale de la cellule divisant l'améloblaste en un corps cellulaire et une extension distale appelée le prolongement de Tomes le long duquel l'émail va se former. Au cours de la différenciation, l'améloblaste devient donc une cellule polarisée, dont la majorité des organites sont situés dans le corps cellulaire en distal du noyau. (Figure 5, stade 3)

Les pré-améloblastes commencent déjà à sécréter les protéines de l'émail, ainsi que pendant une courte période, des protéines normalement synthétisées par les odontoblastes comme la sialophosphoprotéine dentinaire (DSPP). Ces premières protéines matricielles pourraient participer aux interactions épithélio-mésenchymateuses impliquées dans la morphogenèse et la différenciation cellulaire. (Bartlett, 2013; Goldberg and Gaucher, 2011)

Lorsque l'émail initial commence à se former (Figure 6), la surface distale de l'améloblaste est repliée, avec des ébauches de prolongements de Tomes s'étendant au contact de la surface irrégulière de la prédentine sous-jacente. Trois couches d'émail seront successivement déposées par les améloblastes au fur et à mesure de leur maturation :

- une couche initiale aprismatique : en contact avec la jonction amélo-dentinaire, elle correspond à la première couche synthétisée par les améloblastes pré-sécréteurs sans prolongement de Tomes.
- une couche prismatique qui constitue l'essentiel de l'épaisseur de l'émail et qui est formée par les prismes d'émail, l'émail interprismatique et la gaine du prisme
- une couche finale aprismatique externe : elle correspond à la dernière couche synthétisée après l'involution des prolongements de Tomes.

Sur la surface de la dentine, les fins cristaux d'émail de cette couche initiale sont étroitement associés avec le collagène ; ainsi dès le départ, les cristaux d'émail sont intégrés dans la dentine ce qui renforcera à terme la résistance aux pressions et chocs. Dans un premier temps, les dépressions irrégulières sur la surface de la dentine sont remplies, créant des «îlots d'émail» ; ensuite, les ébauches de prolongements de Tomes se retirent de ces cristaux et la membrane cellulaire devient lisse formant un front de minéralisation sans interruption ; la couche d'émail sous-jacente devient alors continue. (Simmer et al., 2012)

Les améloblastes sont alignés les uns à côté des autres et reliés par des complexes de jonction dans leur partie distale (du côté des prolongements de Tomes) et proximale (du côté du stratum intermedium). Ces complexes de jonction servent à réguler les flux vers l'émail en formation.

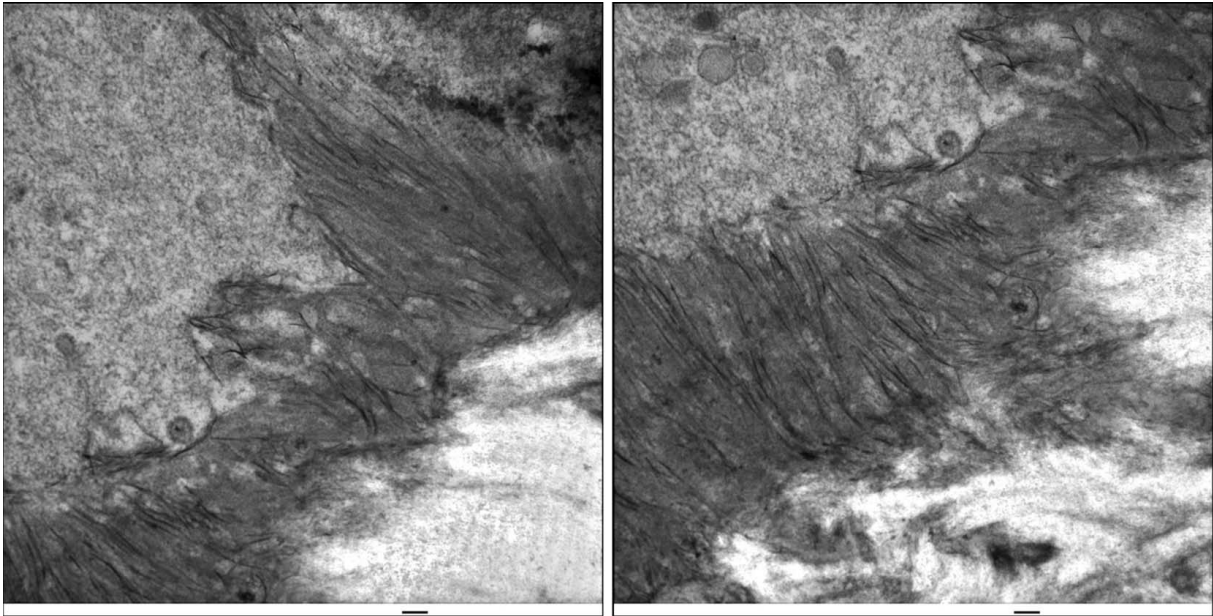


Figure 6 : Images de MET de l'émail synthétisé par l'améloblaste pré-sécréteur. Les cristaux d'émail déposés à la surface de la dentine sont associés à la fois aux fibres de collagène de la dentine et au front de minéralisation de la membrane des améloblastes. (barre d'échelle 100 nm) (Simmer et al., 2012)

2. L'améloblaste sécréteur

L'améloblaste sécréteur présente une intense activité de synthèse et de sécrétion qui se répercute au niveau de son organisation intracellulaire. En effet, cette cellule présente, dans son compartiment supra-nucléaire, un important réticulum endoplasmique granulaire (REG) et un appareil de Golgi central long et cylindrique. Les ARN messagers des protéines amélares sont traduits par les ribosomes sur la membrane du REG, puis les protéines synthétisées sont transloquées dans sa lumière et gagneront l'appareil de Golgi pour y subir des modifications post-traductionnelles et être assemblées dans des granules de sécrétion. Ces granules vont migrer vers l'extrémité distale de la cellule et être libérées dans la matrice extracellulaire au niveau des extrémités latérales ou distales des prolongements de Tomes ; la sécrétion de ces granules est continue. Les protéines sécrétées au niveau des parois latérales du prolongement de Tomes vont former un puits dans lequel réside ce prolongement. Ces puits seront ensuite comblés par la matrice sécrétée au niveau de la partie distale des prolongements. L'émail formé au niveau de ces deux sites est identique, seule l'orientation des cristaux diffère (l'organisation des cristaux sera détaillée dans le chapitre II : l'émail).

Au fur et à mesure de la croissance de l'émail, le prolongement de Tomes va s'allonger au niveau de son extrémité distale, puisqu'à la fin du stade sécrétoire, l'émail aura atteint approximativement son épaisseur finale (Figure 7 stade 4).

L'émail est alors composé d'un mélange de cristaux en formation et de nombreuses protéines. La principale protéine est l'amélogénine ainsi que ses produits de dégradation et des formes issues de l'épissage alternatif de son gène (LRAP). D'autres protéines non-amélogénine sont également présentes comme l'améloblastine, l'énaméline, l'amélotine (AMTN), l'Odontogenic Ameloblast-associated Protein (ODAM), la secretory calcium-binding phosphoprotein proline and glutamine rich 1 (SCPPPQ1) et la tuftéline ainsi que des enzymes comme l'énamélysine (MMP20) et la kallikrein-4 (KLK4). Le rôle de ces protéines ainsi que la chronologie de leur expression (améloblaste sécréteur ou mature) seront détaillés dans le « chapitre II : l'émail ».

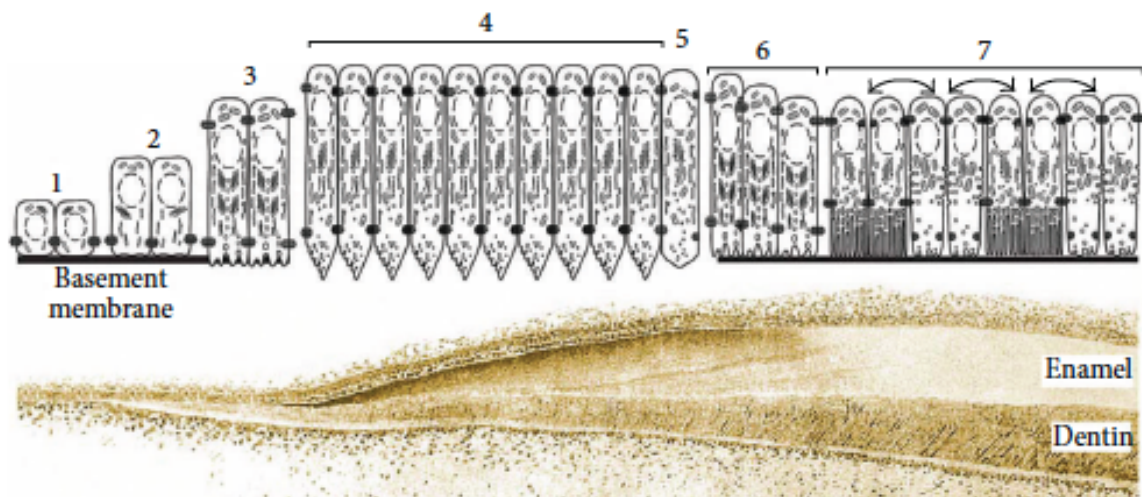


Figure 7. Evolution des améloblastes au cours de la formation de l'émail. Stade 4 : après avoir établi la jonction émail-dentine en déposant une couche d'émail aprismatique, les améloblastes sécréteurs vont développer le prolongement de Tomes. Le long de la face sécrétrice des prolongements de Tomes, l'améloblaste synthétise des protéines au niveau du front de minéralisation où les cristaux s'allongent. (Bartlett, 2013)

3. L'améloblaste mature

C'est durant la phase de maturation que l'émail va progressivement durcir afin de pouvoir résister aux contraintes mécaniques une fois que la dent aura fait son éruption dans la cavité buccale. Le stade de maturation de l'amélogénèse est divisé en deux phases :

- une phase ou stade de transition
- une phase de maturation

a. Phase de transition

Il s'agit d'une phase très courte durant laquelle les cellules vont subir des premiers changements morphologiques ou mourir pour 25% d'entre elles.

Une fois que l'épaisseur totale d'émail immature a été générée à la fin du stade de sécrétion, l'améloblaste va progressivement diminuer de hauteur et de volume ; de même une réduction de la quantité de ses organites est observée. Ces cellules présentent cependant toujours une forte activité métabolique avec un appareil de Golgi volumineux.

b. Phase de maturation

C'est durant cette phase que l'améloblaste va éliminer l'eau et sa matrice organique afin de permettre une augmentation de la densité de minéral et aboutir à un émail mature comprenant 96% de minéral et 4% de matrice organique et d'eau.

Durant la phase de maturation, on va observer deux processus simultanés : l'élimination des protéines de la matrice et l'arrivée massive d'ions calcium et phosphate. Dans ce but, l'améloblaste va alterner entre deux états au niveau de son extrémité distale :

- une cellule à bordure plissée
- une cellule à bordure lisse

Ils passeront 80% du temps sous forme plissée et 20% sous forme lisse. Ces variations morphologiques correspondent à des fonctions bien précises de la cellule, en relation avec l'acidification et la neutralisation du pH de l'émail immature, l'élimination des fragments protéiques et le transport du calcium vers l'émail requis pour la croissance des cristaux. A ce stade, 25% des améloblastes disparaîtront encore par apoptose.

A la fin de la phase de transition, au moment où les améloblastes démarrent leurs premiers cycles de modulation entre bordure plissée et bordure lisse, les cellules vont synthétiser une membrane basale au niveau de leur zone apicale qui est maintenant plate (les prolongements de Tomes ne sont plus visibles à ce stade). Cette membrane basale adhère à la surface de l'émail et les améloblastes s'y attachent par des héli desmosomes via AMTN, ODAM et SCPPPQ1; elle pourrait participer à la régulation des échanges entre l'améloblaste et la couche d'émail.

i. *L'améloblaste mature à bordure plissée*

Les améloblastes à bordure plissée possèdent des complexes de jonctions proximaux lâches et distaux étroits et étanches. Ces cellules présentent une activité d'endocytose très importante avec la présence de nombreux lysosomes, protéines de liaison du calcium (la calbindine et l'annexine) et d'adénosines triphosphatases (ATPases) transmembranaires associées au calcium qui semblent pomper le calcium vers l'émail mature afin de permettre la maturation des cristaux. De plus, l'améloblaste à bordure plissée sécrète une quantité importante d'anhydrase carbonique de type II qui libère des ions bicarbonates neutralisant ainsi le pH de la matrice acidifié par le relargage des protons liés à la maturation des cristaux. (Lacruz et al., 2010; Lin et al., 1994).

ii. *L'améloblaste mature à bordure lisse*

Les améloblastes à bordure lisse possèdent, à l'inverse, des complexes de jonctions proximaux étroits et étanches et distaux lâches. Ces cellules semblent relarguer les petites protéines et autres molécules dans la matrice extracellulaire, montrent une faible activité d'endocytose et ne présentent qu'une très faible activité des ATPases membranaires. Le fluide interstitiel qui s'échapperait permettrait également de contribuer à la neutralisation du pH de la matrice amélaire. Comme nous l'avons évoqué précédemment, la maturation des cristaux est liée à l'arrivée massive d'ions calcium et phosphates qui viennent des milieux interstitiels par la circulation sanguine du follicule dentaire. Ces ions peuvent passer entre les cellules à bordure lisse car les systèmes de jonction distaux sont perméables.

Ce contrôle du pH, à la fois par les améloblastes à bordure plissée et lisse, contribuerait ainsi au bon fonctionnement des enzymes de dégradation de la matrice et à une croissance harmonieuse des cristaux (Nanci, 2003).

c. Phase de protection

Les améloblastes matures deviennent des améloblastes de protection, de forme cubique. Ces cellules vont constituer avec les autres couches des cellules de l'organe de l'émail, la couche papillaire ; il s'agit d'un épithélium réduit dont le rôle est de protéger l'émail du follicule dentaire jusqu'à l'éruption de la dent. Quand la dent évolue dans la cavité buccale, une partie des cellules de l'organe de l'émail persiste et participe à la formation des structures de jonction épithéliales qui relient le parodonte à la dent (Piette and Goldberg, 2001).

Chapitre 2 : l'émail

L'émail mature est le tissu le plus minéralisé du corps humain, il est constitué d'environ 96% de minéral et 4% de matrice organique et d'eau. La matrice minéralisée est formée de cristaux de phosphate de calcium : l'hydroxyapatite, de formule $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})$ dans laquelle l'ion OH^- peut être remplacé par le fluor, le chlore ou le carbonate.

Du fait de sa très forte minéralisation, l'émail est extrêmement dur, ce qui lui permet de résister aux forces masticatoires, mais le rend également cassant ; c'est pourquoi la couche de dentine sous-jacente, plus flexible, est indispensable au maintien de son intégrité. En effet, lors d'atteintes carieuses ou de défaut de constitution de la dentine, l'émail non soutenu va se fracturer facilement.

L'émail est translucide et présente une teinte allant du jaune clair au blanc-gris ; son épaisseur varie également en fonction de sa position sur la couronne dentaire, pouvant aller de 2,5 mm sur les faces occlusales à quelques microns au niveau du collet (Nanci, 2003)

I. Les protéines amélares

1. L'amélogénine

L'amélogénine est la principale protéine de la matrice de l'émail, elle est critique pour sa formation et est déjà sécrétée par l'améloblaste pré-sécréteur. Elle représente 80% des protéines sécrétées par l'améloblaste sécréteur.

Le gène de l'amélogénine est situé sur les chromosomes X et Y chez l'homme et le porc et sur le X uniquement chez la souris. Les animaux KO pour l'amélogénine présentent un émail hypoplasique et hypominéralisé similaire à celui observé chez les patients atteints d'amélogenèse imparfaite (Gibson et al., 2001) (Figure 8).

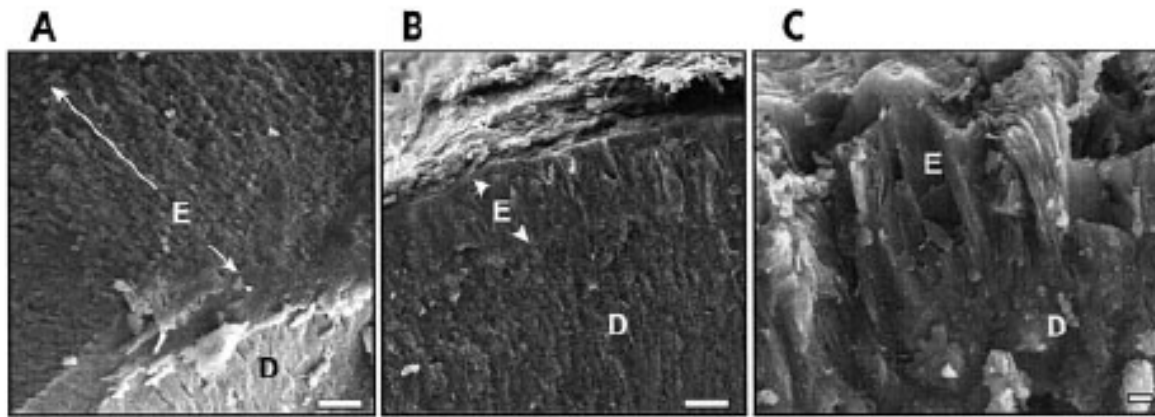


Figure 8 : Vues en MEB d'incisives fracturées de souris WT et KO de 16 semaines. L'émail (E) et la jonction avec la dentine (D) sont mis en évidence. A, souris wild-type (WT). B, l'émail de la souris KO ne présente pas de structure prismatique normale et est plus fin comparativement au WT vus au même grossissement. C, Plus fort grossissement de la couche d'émail de l'animal KO. Barres d'échelle en A et B = 10 μ m et C = 1 μ m (Gibson et al., 2001).

Des expériences de délétions ciblées et la génération de souris transgéniques (Gibson et al., 2005; Li et al., 2008) ont permis de mieux comprendre le rôle de l'amélogénine *in vivo*. Ainsi l'amélogénine est responsable de l'épaisseur et de la structure de l'émail mais en revanche pas de l'initiation de la minéralisation au niveau de la jonction amélo-dentinaire (Gibson et al., 2005).

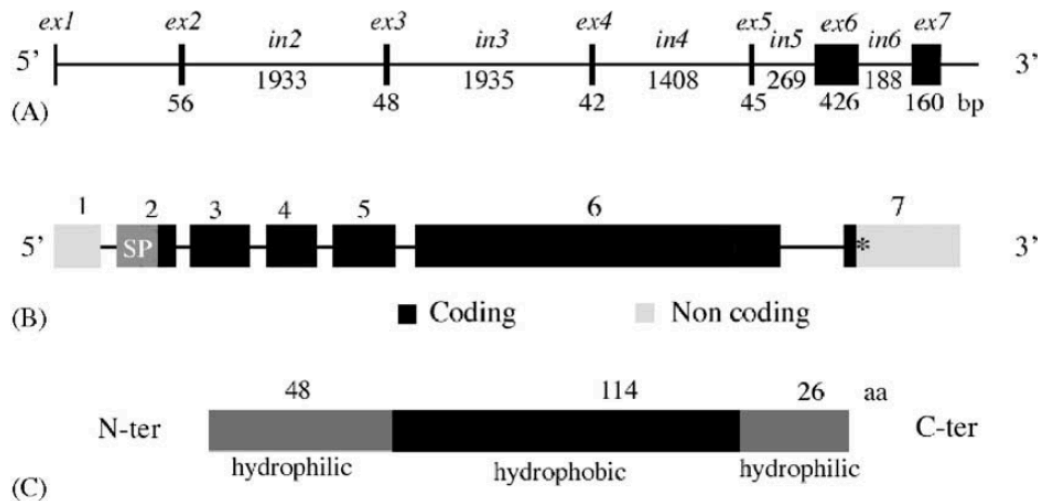


Figure 9. Gène de l'amélogénine chez le mammifère. A, structure du gène. Les 5 premiers exons sont courts (42-56pb) et les exons 6 (425pb) et 7 (160pb) sont grands. B, Exons codants et non codants : l'exon 1 est non codant, la majorité de l'exon 2 code pour le peptide signal, seuls les 3 premiers nucléotides de l'exon 7 codent pour la protéine. C, représentation linéaire de la protéine synthétisée sous sa forme native (Sire et al., 2005)

La séquence d'acides aminés de l'amélogénine à ses extrémités N- et C-terminales est hautement conservée chez les mammifères (Delgado et al., 2008; Sire et al., 2005) (Figures 9 et 10). La région C-terminale (résidus 13-15) est fortement chargée (pI 4,2), tandis que la protéine entière a un pI de 8,0 (Fincham et al., 1999).

		2 3		3 5		5 6		TRAP	
		1						↓ ↓	
Ancestral mammal	IP	LPPHPGHPGYINFSYE	VL	TPLK	WYQSMIRHE	YPSYGYEF	MGGWL	HH	
Crocodile	--	-----H-----V-----		-----LM-QP	-S-	-----Q			
Snake	--	***Q-----	-M-	-----F--I-G-Q	--R-	-----M--			
Lizard	--	---AR---V-----	-I-	-----L-G-Q	--R-	---I-S-MR-			
Ancestral mammal	QIIPVLSQQQTPTHALQPHHHIPVMAAQQPMQPPQPMMPMPGQHSVTPTQHH								
Crocodile	PMLPIAQQHPIQTLTPHHQIPFLSPQHPLMQMPGPHQMMP								
Snake	ATGPMHPPHFGVQTIHPALHQKQPQQLPQNPLQQLPGLNAFVPLNGHNAL								
Lizard	HSGPMLPQLPHFSIYQSLHPMQTHLKQLHHLPPQNPSMQQPAHHFVPMPTGQ								
Ancestral mammal	QSNLPQPAQQPFQPLPQQPPHQPIQPQAPVHPMQPPMPQP								
Crocodile	VQEPVQPQAGEHPSPPVQPQQPGHPNPPMQPLPGSPHPPMRPQQPGI								
Snake	I PHYQHPFQPQAGEHPIQSLSPVNPMPNPQQPGNANQ								
Lizard	NSLNPHFQFVHAAPAQHPLAHTGQQPVQPQQPDHNSNHPVQHQQPAD								
				LRAP		6 7			
				↓					
Ancestral mammal	PLPPMFPMQ	PLPPLL	PDLPLE	AWPATD	KTREEV	DZ			
Crocodile	-N--Y--	-----M--P-RPM	-----Q--I	--					
Snake	-I***Y***	-----VI--T--S--*	-----K--	--					
Lizard	-IQ--Y-VFQ	-----MI-----P--A--Q--	--						

Figure 10. Séquence en acides aminés de l'amélogénine chez les amniotes : ancêtre mammifère, crocodile, serpent et lézard. La région variable de l'exon 6 (en gris) ne peut être alignée. TRAP : site protéolytique aboutissant aux peptides riches en tyrosine ; LRAP : locus du site de clivage intra-exon chez le mammifère aboutissant à la transcription du peptide (Sire et al., 2005)

a. Rôle morphogénique

L'amélogénine a une forme allongée lorsqu'elle est sécrétée (Delak et al., 2009). Plusieurs molécules vont ensuite pouvoir s'assembler pour former des nanosphères qui vont elles-mêmes s'aligner en formant des chaînes qui vont guider la formation des cristaux d'HAP de l'émail (Paine and Snead, 1997; Paine et al., 2003a) (Figure 11). Il a été montré que la présence de l'extrémité C-terminale de la molécule était indispensable à la formation de ces nanosphères (Aichmayer et al., 2005; Beniash et al., 2005; Fincham et al., 1995; Fowler et al., 2006; Moradian-Oldak, 2001; Moradian-Oldak et al., 2002; Pugach et al., 2010) et que les conditions environnementales (pH, température, calcium, ion chlorure) étaient également

critiques pour la formation des nanosphères ainsi que leur assemblage (Aichmayer et al., 2010; Buchko et al., 2008; Moradian-Oldak and Goldberg, 2005; Moradian-Oldak et al., 2006; Petta et al., 2006; Wiedemann-Bidlack et al., 2007).

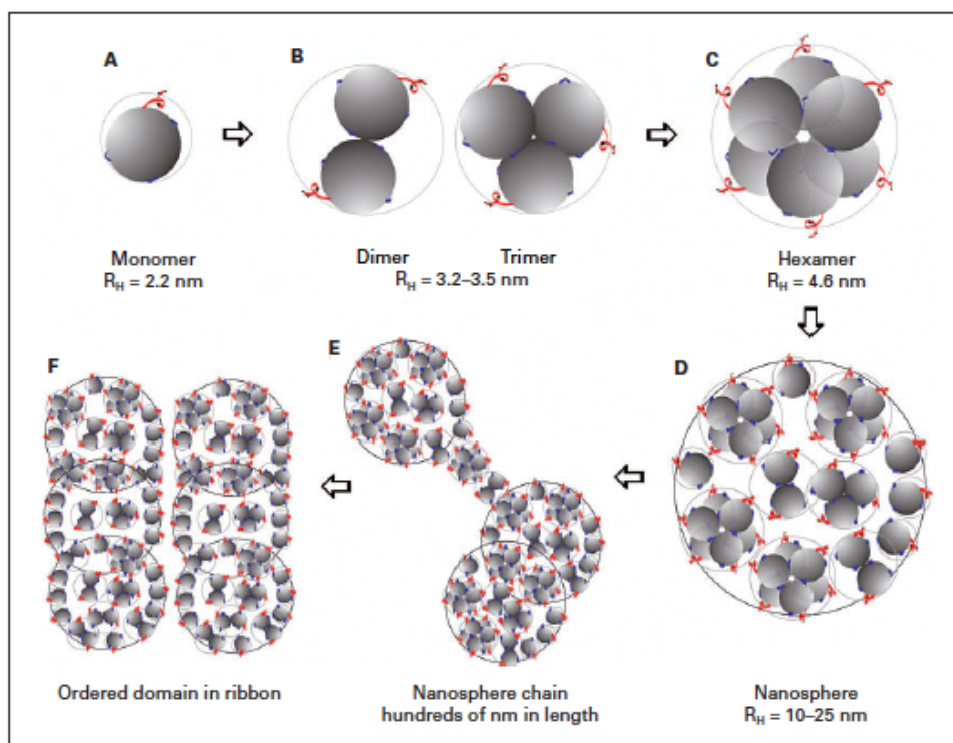


Figure 11. Représentation schématique de l'assemblage séquentiel de l'amélogénine. Les monomères s'assemblent en dimères, trimères ou hexamères pour former des nanosphères ; ces nanosphères s'assembleront en nanochaînes puis éventuellement en micro rubans. (Du et al., 2005; Moradian-Oldak and Goldberg, 2005)

Le rôle des extrémités de la protéine sur la morphologie et l'organisation des cristaux néoformés a également été étudié. Il apparaît que l'amélogénine se lie à l'HAP au niveau de son extrémité C-terminale (Fincham et al., 1999; Kwak et al., 2009; Margolis et al., 2014; Pugach et al., 2010; Tarasevich et al., 2007) et que la proline présente au niveau de cette extrémité joue un rôle prépondérant dans cette interaction protéine-minéral (Paine et al., 2003a; Zhu et al., 2009). La formation des chaînes d'amélogénine vient ensuite guider l'allongement des cristaux d'HAP en formation (Yang et al., 2010) (Figure 12).

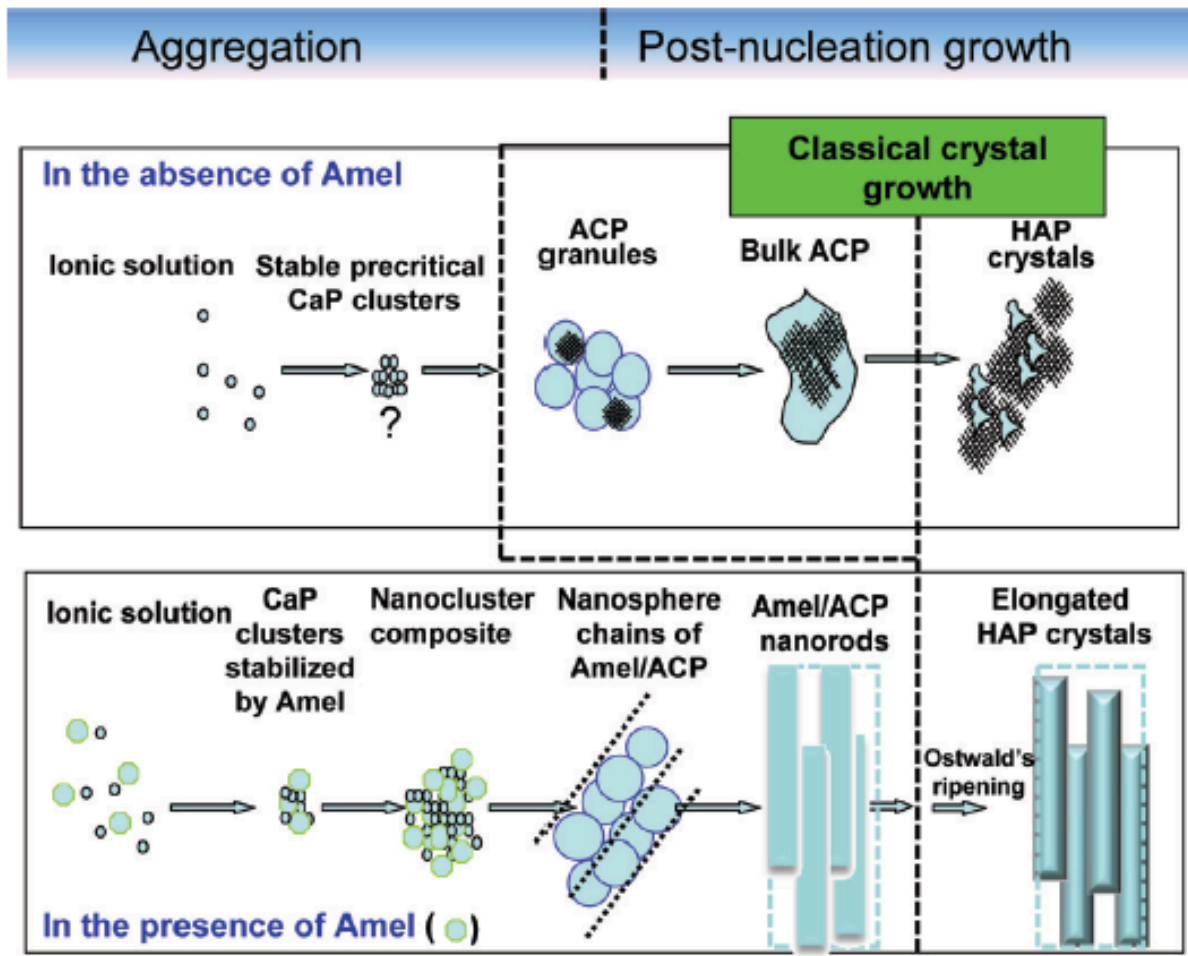


Figure 12. Mécanisme proposé pour l'organisation *in vitro* de microstructures d'HAP allongées et hiérarchiquement organisées, formées par co-assemblage de nanoblocs d'amélogénine et de phosphate de calcium (Yang et al., 2010)

b. Rôle de signalisation

L'amélogénine a été retrouvée dans de nombreux tissus du complexe cranio-facial embryonnaire de souris tels que le cerveau, les yeux, les ganglions, les troncs nerveux périphériques, le cartilage et l'os ; elle est déjà exprimée chez la souris à E10.5 dans le cerveau et les yeux, soit longtemps avant l'initiation de la formation de la dent (Gruenbaum-Cohen et al., 2009). Elle semble donc dotée de fonctions autres que celle de protéine de structure de l'émail et apparaît comme multifonctionnelle.

Par ailleurs, la forme complète de l'amélogénine a un effet de rétrocontrôle en entraînant une augmentation de l'expression de son gène (Xu et al., 2006, 2008).

2. Leucine Rich Amelogenin Peptide (LRAP)

Le Leucine Rich Amelogenin Peptide (LRAP) est la deuxième forme la plus abondante des amélogénines (Fincham et al., 1983) et résulte du saut de l'exon 4 du gène AmelX et de l'épissage sur la majeure partie de l'exon 6, ce qui entraîne une amélogénine de 59 acides aminés pour la forme murine et de 56 pour la forme porcine (Bonass et al., 1994; Gibson et al., 1991). Elle est sécrétée tout au long de l'amélogenèse, contrairement à la forme complète de la protéine qui est principalement produite par l'améloblaste sécréteur (Yuan et al., 1996) sous la forme phosphorylée (Fincham and Moradian-Oldak, 1993). LRAP possède les deux extrémités N- et C-terminales de la forme complète (Figure 13) et sa séquence est très conservée à travers les espèces (Bonass et al., 1994; Ryu et al., 1996).

P173 :

MPLPPHPGHPGYINF^SYEVLTPLKQWYQNMIRHPYTSYGYEPMGGWHLHHQIIPV
VSQQTPQSHALQPHHIPMVPAQQPGIPQQPMMPLPGQHSMTQHHQPNLPLPAQQPF
QQPVQPQPHQPLQPQSPMHPIQPLLQPPLPPQPPMFSMQ**SLLDLPEAWPATDKT**
KREEVD

LRAP :

MPLPPHPGHPGYINF^SYEVLTPLKQWYQNMIRHPSLLDLPEAWPATDKTKREEVD

Figure 13. Séquence en acides aminés des formes porcines d'amélogénine complète (P173) et LRAP (P56). En bleu, l'extrémité N-terminale, en vert l'extrémité C-terminale, souligné le domaine hydrophile de l'extrémité C-terminale.

a. Rôle de signalisation

Tout comme la forme complète de l'amélogénine, LRAP a été retrouvé dans des tissus non dentaires comme la calvaria, les os longs, le cerveau, les yeux et la peau (Li et al., 2006).

Les premières études portant sur LRAP au niveau dentaire se sont intéressées à son rôle en tant que molécule de signalisation. Dans une revue de la littérature, Veis (Veis, 2003) a rappelé l'expression de LRAP par le pré-odontoblaste : LRAP inhiberait la maturation de l'améloblaste et la sécrétion de la matrice d'amélogénine nécessaire à la minéralisation jusqu'à ce qu'une couche de dentine minéralisée ait été formée. La synthèse de LRAP par

l'odontoblaste et son effet sur la prolifération des cellules pulpaire a été confirmé par les travaux de Ye (Ye et al., 2006).

Des études ont montré l'expression de LRAP à un faible niveau, par les cellules de la papille dentaire et les cellules parodontales (Hatakeyama et al., 2003; Nebgen et al., 1999) ; d'autres ont décrit pour LRAP un rôle dans la cémentogenèse (Boabaid et al., 2004; Popowics et al., 2005) et dans l'ostéogenèse (Hatakeyama et al., 2006; Jegat et al., 2007; Warotayanont et al., 2008, 2009).

LRAP entraînerait également une accélération de la différenciation des cellules de l'organe de l'émail et une augmentation de l'expression d'amélogénine par ces cellules via le récepteur membranaire LAMP-1 et la voie de signalisation NO (Nitric Oxide) (Iacob and Veis, 2008; Le et al., 2007). Similairement, LRAP entraînerait une accélération de la différenciation des améloblastes et une augmentation de l'épaisseur d'émail synthétisé par les améloblastes pré-sécréteurs (E16) (Ravindranath et al., 2007).

b. Rôle morphogénique

Habelitz et coll. (Habelitz et al., 2006) ont montré que LRAP, comme la forme complète de l'amélogénine avait la capacité de s'assembler pour former des nanosphères et que LRAP se liait également à l'hydroxyapatite au niveau de son extrémité C-terminale (Shaw and Ferris, 2008; Shaw et al., 2004) avec une affinité pour le calcium supérieure à celle retrouvée pour la forme compète de la protéine (Le et al., 2006).

LRAP pourrait donc participer également au processus de minéralisation de l'émail. Cette hypothèse est renforcée par des études utilisant des souris transgéniques entraînant une surexpression de LRAP chez l'animal amélogénine KO ; ces travaux ont montré un rattrapage partiel du phénotype amélaire avec une amélioration de l'organisation des cristaux d'émail chez ces souris comparativement aux KO (Gibson et al., 2009).

3. Dégradation enzymatique de l'amélogénine

L'amélogénine est transformée en des formes de plus faible poids moléculaire au cours des différentes étapes de l'amélogenèse par l'action de l'énamélysine (MMP-20) au cours de la phase sécrétrice puis par la Kallikrein-Related Peptidase-4 (KLK-4) au cours de la phase de

maturation (Figure 14). Cette dégradation permet l'élimination de la protéine dans la matrice d'émail mature.

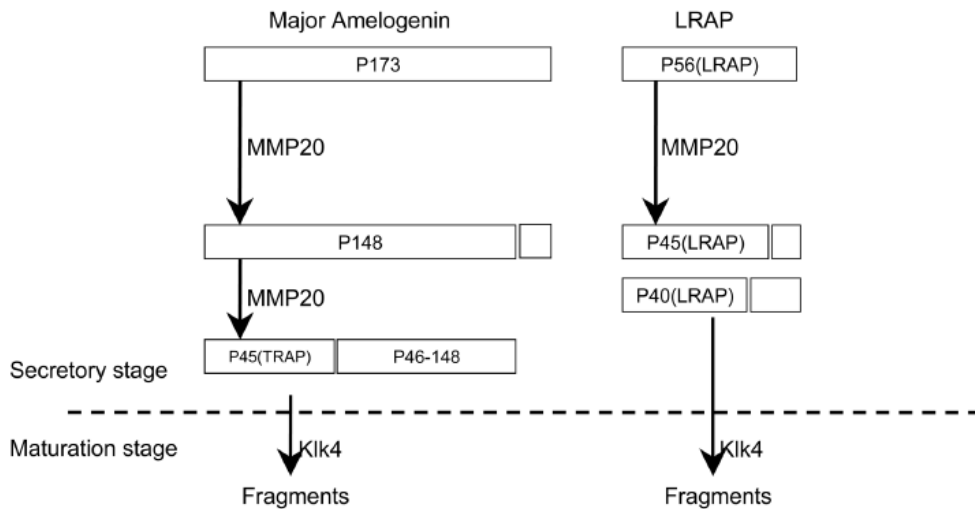


Figure 14. Isoformes de l'amélogénine porcine et produits de clivage. La principale protéine (P173) et la seconde protéine la plus abondante (LRAP) sont dégradées par deux protéases extracellulaires : MMP20 et KLK-4. MMP20 est exprimée durant la phase de sécrétion alors que Klk4 est exprimée durant la phase de maturation (Yoshizaki and Yamada, 2013).

a. MMP-20

MMP-20 est exprimée tout au long du stade sécréteur jusqu'au début du stade de maturation et est une métalloprotéinase spécifique de l'organe dentaire puisqu'elle n'est retrouvée que dans l'odontoblaste et l'améloblaste. C'est également la seule protéinase présente durant ce stade. L'étude de la digestion de P173 et de LRAP par MMP-20 a révélé une voie unique de traitement. MMP-20 clive la P173 en un site unique et génère le P148, produit de clivage le plus abondant. P148 est à son tour clivé par MMP-20 pour générer le P45 (Tyrosine Rich Amelogenin Polypeptide ou TRAP) et le P46-148. LRAP est dégradé au niveau de deux sites de clivage qui génèrent le P45 ou le P40 (Figure 14) (Bartlett, 2013; Yoshizaki and Yamada, 2013).

Les souris MMP-20 KO ont permis de mieux comprendre le rôle de cette enzyme ainsi que des produits de dégradation. Les souris ainsi générées présentent une perturbation de l'organisation prismatique ainsi qu'un émail hypoplasique (plus fin) et qui se détache de la dentine avec une réduction globale de la quantité de minéral de 50%. Ces études ont également mis en évidence une perturbation de l'organisation et de l'évolution des prolongements de Tomes (Bartlett, 2013).

b. KLK-4

La Kallikrein-Related Peptidase-4 (KLK-4) est exprimée dès le début du stade de maturation (phase de transition) de l'amélogénèse. Similairement à la MMP-20, KLK-4 n'a pas été retrouvée dans d'autres tissus que les dents en développement. KLK-4 clive les différentes formes d'amélogénine en petits peptides afin de faciliter leur transport en dehors de la matrice de l'émail et permettre la maturation des cristaux d'hydroxyapatite.

Les souris KLK-4 KO ont permis de mieux comprendre le rôle de cette enzyme. Les dents de ces animaux présentent un aspect normal jusqu'au début du stade de maturation de l'émail en développement. À ce stade, l'exportation de protéines de la matrice de l'émail vers les améloblastes destinés à la dégradation lysosomale est bloquée. Les protéines amélaire qui auraient dû être dégradées sont donc toujours présentes ce qui aboutit à une diminution du contenu minéral de l'émail au profit du contenu protéique et entraîne une abrasion pathologique des dents de ces souris. Ce phénotype est donc en accord avec l'hypothèse selon laquelle KLK-4 servirait à cliver les protéines de la matrice de l'émail pour faciliter leur exportation par les améloblastes à bords plissés hors de l'émail en cours de minéralisation. Cependant ces souris ont également révélé un phénotype inattendu : parfois seul l'émail prismatique s'est détaché de l'émail inter-prismatique laissant apparaître des puits ; la structure de l'émail est donc normale chez ces animaux mais il n'y a une mauvaise adhésion entre les deux type de cristaux (Figure 15) (Bartlett, 2013).

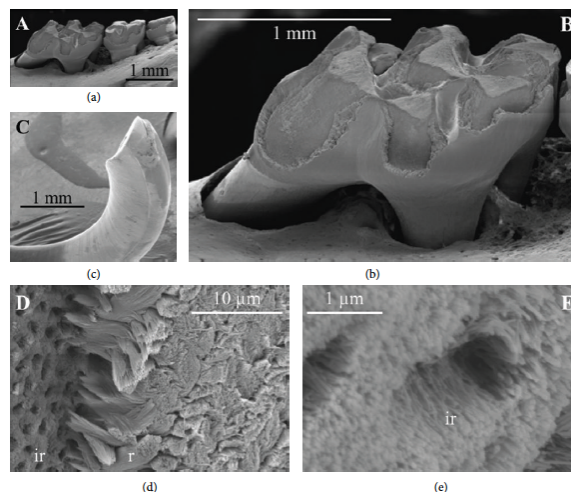


Figure 15. Vues en MEB de molaires (a, b) et d'incisive (c, d) de souris KO pour KLK-4 de 7 semaines. Toutes les molaires présentent une perte d'émail au niveau occlusal (a, b) et de façon similaire la surface travaillante des incisives est altérée. (c) Une vue à plus fort grossissement de l'incisive révèle que la fracture a lieu dans la couche d'émail et non au niveau de la jonction amélo-dentinaire. La surface fracturée semble composée d'émail interprismatique avec des trous là où l'émail prismatique s'est séparé de la couche initiale d'émail. (Bartlett, 2013)

4. Protéines non amélogénine

L'énaméline et l'améloblastine sont, avec l'amélogénine, les trois protéines structurales majeures de la matrice de l'email. Ces protéines sont dérivées d'un gène ancestral appartenant à la famille des phosphoprotéines sécrétées liant le calcium (SCCP) (Kawasaki and Weiss, 2003). L'énaméline et l'améloblastine sont situées sur une petite zone du bras q du 4^{ème} chromosome humain (4q13). Comme nous l'avons mentionné précédemment, le gène humain de l'amélogénine est localisé sur les chromosomes X et Y, mais il a été proposé que le gène de l'amélogénine se serait transloqué sur les chromosomes sexuels alors que ceux de l'énaméline et l'améloblastine seraient restés sur leur chromosome d'origine.

L'améloblastine (AMBM) est une glycoprotéine spécifique de la dent qui est riche en proline, glycine et en leucine. Des expériences d'immunohistochimie ont montré que cette protéine se situe entre les prismes d'email et une zone appelée espace de la gaine. L'améloblastine est également clivée par MMP-20 et KLK-4 et ce sont ses produits de clivage qui sont en réalité situés dans l'espace de la gaine. L'améloblastine intacte est retrouvée dans l'email nouvellement formé et s'accumule sur les prismes d'email (Uchida et al., 1997).

L'énaméline (ENAM) contient des domaines hydrophobes, acides et basiques dans les différentes régions de la molécule et est également dégradée par MMP-20 et KLK-4. Des souris ENAM KO ont permis de mieux comprendre le rôle de cette protéine. Ces animaux présentent un email hypominéralisé au niveau des couronnes des molaires et des incisives. La minéralisation au niveau de la couche d'email est insuffisante pour être révélée par une coloration Von Kossa ; toutefois quelques nodules de minéralisation situés au niveau de la jonction amélo-dentinaire sont observables. Une couche épaisse de protéine amélaire est également accumulée au niveau de la matrice extracellulaire située à proximité des améloblastes sécréteurs mais aucune minéralisation n'est apparente au niveau du front de minéralisation. L'énaméline aurait donc un rôle essentiel au niveau du front de minéralisation favorisant ou catalysant la croissance des cristaux d'email (Hu et al., 2008).

Les deux protéines énaméline et améloblastine semblent donc avoir des fonctions similaires à l'égard de l'initiation de la formation des cristaux d'email, alors que l'amélogénine semble créer un cadre qui permet l'allongement continu des cristaux déjà amorcés.

Plus récemment, d'autres protéines de la matrice de l'email, l'amélotine (AMTN), l'Odontogenic Ameloblast-Associated Protein (ODAM) et la Secretory Calcium-binding

Phosphoprotein Proline and glutamine rich 1 (SCPPPQ1) ont été identifiées. AMTN, ODAM et SCPPPQ1 sont exprimées durant le stade de maturation de l'amélogenèse (Bartlett and Simmer, 2015).

Ces trois protéines sont également des membres de la famille des phosphoprotéines sécrétées liant le calcium (SCPP). Elles se localisent au niveau de la membrane basale des améloblastes matures et ont un rôle dans l'attachement de ces cellules épithéliales à la surface minéralisée des dents en formation (Moffatt et al., 2014). En ce qui concerne l'amélotine, il a également été démontré que son expression commence au stade de transition et continue durant toute la phase de maturation puis dans la courte phase précédant l'éruption dentaire (Somogyi-Ganss et al., 2012).

Une autre protéine, la tuftéline semble jouer un rôle important au cours du développement et de la minéralisation de l'émail, en particulier dans la nucléation et la croissance cristalline au niveau de la jonction amélo-dentinaire (Deutsch et al., 2002). Paine et coll. (Paine et al., 2000) ont suggéré qu'elle pourrait avoir un rôle dans le transport et/ou la sécrétion cellulaire. La tuftéline est exprimée à un stade très précoce de l'odontogenèse (stade du bourgeon) et est exprimé par les améloblastes sécréteurs au niveau des prolongements de Tomes ; elle est retrouvée le plus abondamment au niveau de la jonction amélo-dentinaire. Cette protéine a, comme l'amélogénine, la capacité de s'auto-assembler mais les deux protéines ne semblent pas interagir (Paine et al., 2000). La tuftéline est également exprimée dans de nombreux tissus mous non minéralisant, ce qui implique qu'elle pourrait avoir un rôle multifonctionnel (Mao et al., 2001).

II. Structure de l'émail

La structure de l'émail dentaire est constituée presque exclusivement de petits cristaux d'hydroxyapatite, ce qui représente environ 87% du volume et environ 95% du poids de l'émail. La complexité de la structure de l'émail est liée à la façon dont ces cristaux d'hydroxyapatite sont disposés dans l'espace. Chez les mammifères, les cristaux sont organisés en prismes d'émail ou en émail interprismatique (Figure 16). Comme nous l'avons abordé dans le chapitre précédent, on distinguera trois couches d'émail successives et d'organisation différente (Figure 17):

- une couche initiale aprismatique : en contact avec la jonction amélo-dentinaire, elle correspond à la première couche synthétisée par les améloblastes pré-sécréteurs sans prolongement de Tomes,
- une couche prismatique qui constitue l'essentiel de l'épaisseur de l'émail et qui est formée par les prismes d'émail, l'émail interprismatique et la gaine du prisme,
- une couche finale aprismatique externe : elle correspond à la dernière couche synthétisée après l'involution des prolongements de Tomes.

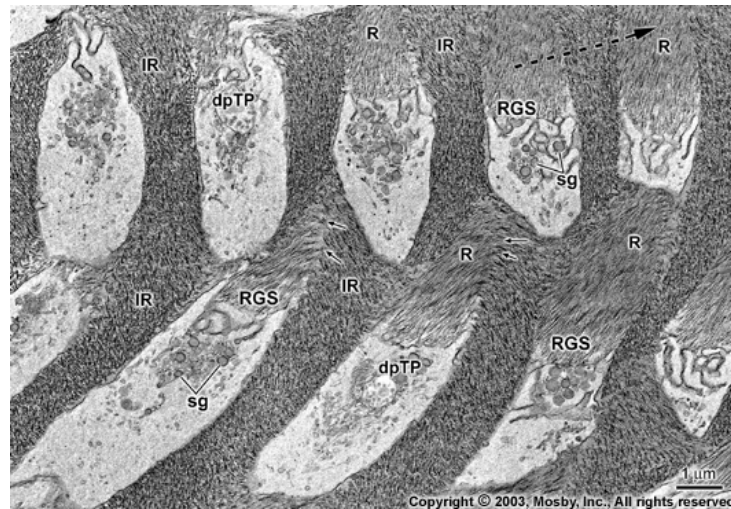


Figure 16 : Coupe transversale des prolongements de Tomes (dpTP) entourés d'émail interprismatique (IR). R, prismes d'émail ; RGS : site de croissance des cristaux ; sg : granule de sécrétion (Nanci, 2003).

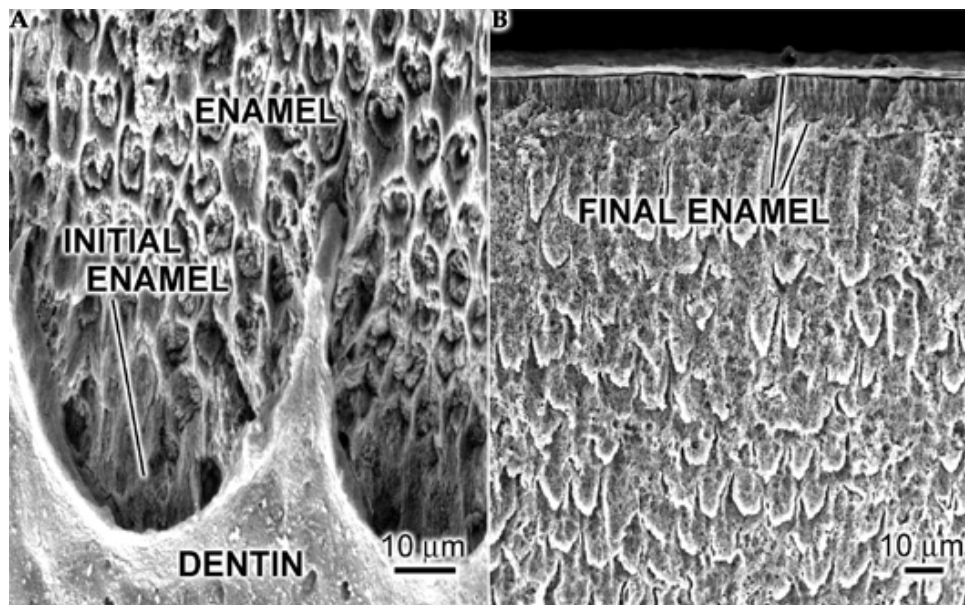


Figure 17 : Les couches initiales (image gauche) et finale (image droite) d'émail sont aprismatiques (Nanci, 2003).

1. Les cristaux d'émail

Les cristaux d'émail ont été décrits initialement comme des structures hexagonales, prismatiques en coupe transversale d'où leur nom de prismes d'émail.

Les motifs structuraux les plus petits sont des cristaux lamellaires ou en forme d'aiguille d'hydroxyapatite qui sont presque rectangulaires en section transversale (Frazier, 1968) avec une largeur moyenne de 68 nm et une épaisseur moyenne de 26 nm (Kerebel et al., 1979). Ils ont une apparence de bâtonnets allongés dans l'émail immature. Ces cristaux vont ensuite s'épaissir et s'élargir dans l'émail mature (Figures 18 et 19).

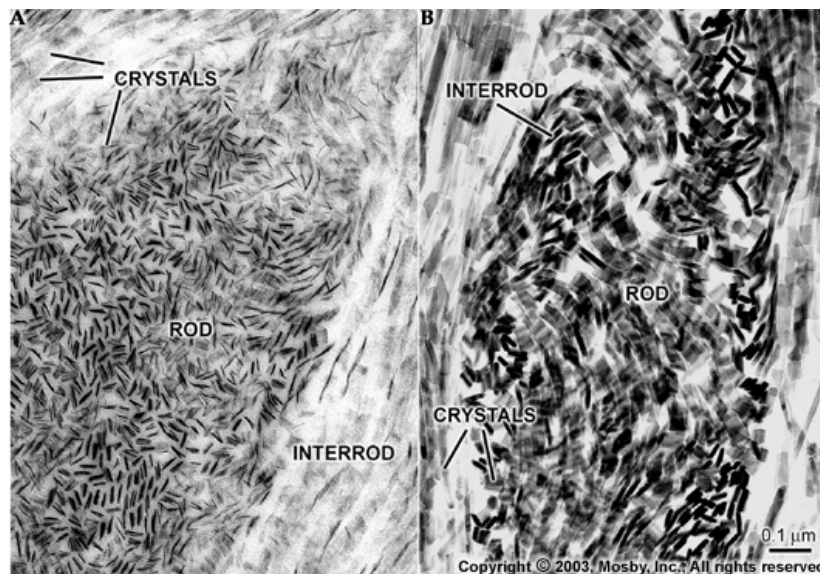


Figure 18 : Vues en microscopie électronique à transmission de prismes d'émail entourés d'émail interprismatique dans l'émail de dents de rongeur en formation à un stade précoce (A) et tardif (B) (Nanci, 2003).

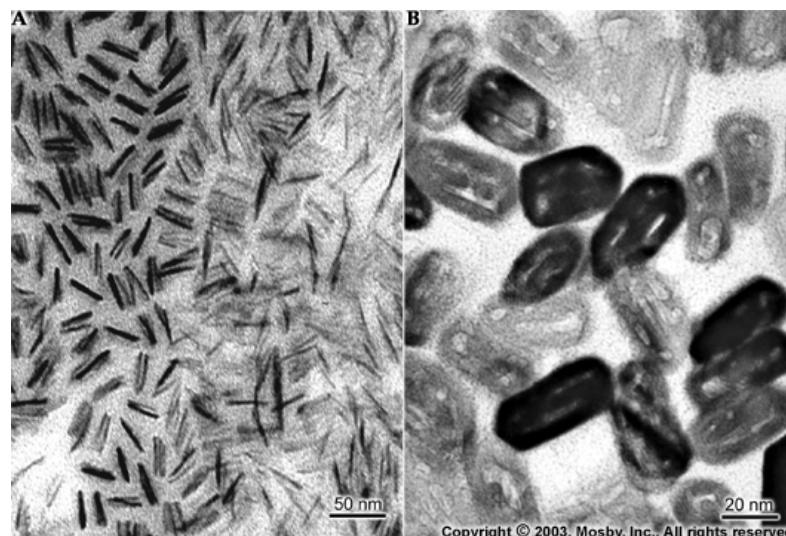


Figure 19 : Coupes transversales de cristaux d'émail récemment formés au cours du stade de sécrétion (A) ou plus anciens, formés au cours du stade de maturation (B) (Nanci, 2003).

Dans l'émail humain, ces cristaux d'hydroxyapatite sont organisés et regroupés par les protéines et enzymes amélaire en des structures plus larges appelées prismes d'émail. A ce niveau, l'orientation des cristaux d'hydroxyapatite varie. Les cristaux de la partie centrale du prisme sont parallèles à son axe, tandis que ceux à proximité du bord du prisme ont généralement un angle de près de 45° par rapport à son axe longitudinal (Poole and Brooks, 1961). Les cristaux sont également organisés de façon circonférentielle dans le grand axe de la dent. Ils ont une orientation perpendiculaire à la surface de la dentine et une angulation d'environ 30° à la surface de la dent (Warshawsky, 1971; Warshawsky and Smith, 1971).

2. Prisme d'émail et émail interprismatique

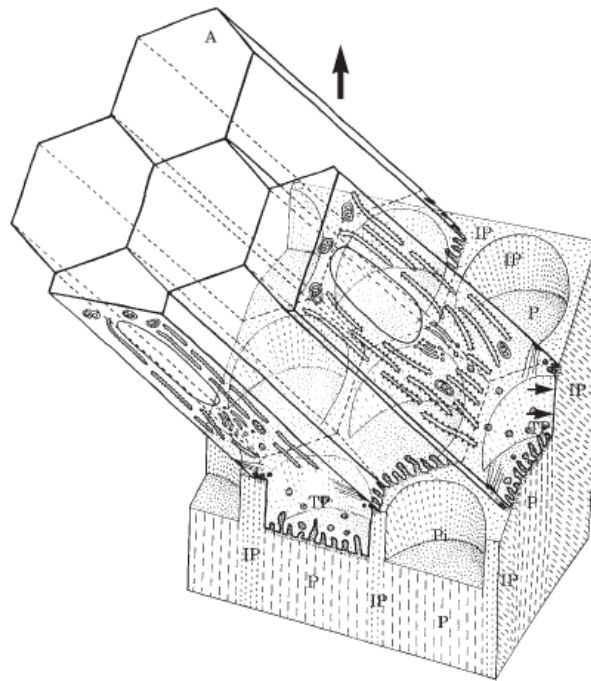


Figure 20 : Représentation schématique d'un bloc d'émail en développement et ses rapports à l'améloblaste (A). Les prolongements de Tomes (TP) occupent les puits (Pi) de la surface de l'émail. L'améloblaste se déplace dans la direction de la flèche. L'orientation des cristaux est indiquée par les pointillés. P : prismes d'émail (Risnes, 1998).

La face sécrétoire du prolongement de Tomes est responsable de la formation du prisme d'émail ; la face apicale de l'améloblaste, qui forme un coude entourant la base du prolongement de Tomes, est le site de sécrétion de l'émail interprismatique. Les faces latérales du prolongement de Tomes sont non sécrétoires et sont les sites où la gaine du prisme se développe, à la frontière entre deux prismes ou entre un prisme et une zone

interprismatique. Par conséquent, la forme de la partie sécrétoire du prolongement de Tomes régit la forme et l'emplacement des composants prismatiques et interprismatiques de l'émail mature (Risnes, 1998) (Figure 20). De même, l'angle formé par les cristaux présents au sein de ces deux structures est le reflet de l'angle entre les différentes parties du prolongement de Tomes qui contribuent à leurs matrices respectives, soit environ 60° (He and Swain, 2008). Cette organisation, donne à l'émail interprismatique humain une forme caractéristique en « trou de serrure » en coupe axiale (Figure 21).

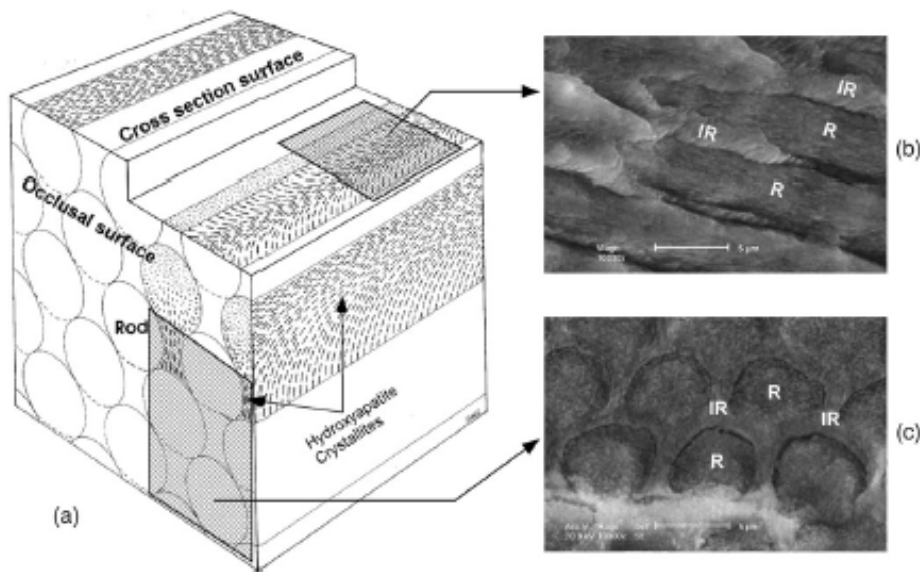


Figure 21: (a) Illustration schématique de la structure de l'émail. La surface occlusale correspond à la surface de la dent dans laquelle les cristaux sont orientés de telle sorte que leur axe c soit parallèle aux forces de mastication. (b) et (c), images en MEB des différentes faces après mordantage à l'acide phosphorique à 37% pendant 5 secondes. R : émail prismatique, IR émail interprismatique (He and Swain, 2008).

C'est donc l'émail interprismatique qui va être sécrété en premier et qui va définir des puits d'émail occupés d'abord par les prolongements de Tomes puis par les prismes d'émail (Figure 22).

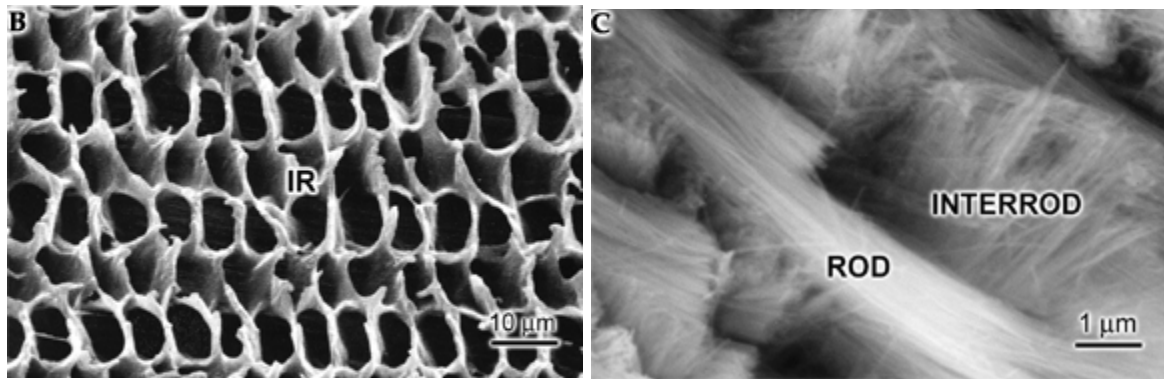


Figure 22 : Images en microscopie à balayage présentant les différents aspects de l'émail d'incisive de rat. B, Les cavités interprismatiques sont organisées en rangs alternés où viendront se loger les prismes d'émail ; C, l'émail prismatique et interprismatique est composé de cristaux d'hydroxyapatite fins et longs (Nanci, 2003)

3. La gaine du prisme

A la fin du stade de maturation, bien que la majeure partie de la matrice organique de l'émail ait été éliminée, des protéines (notamment l'améloblastine), sont maintenues au niveau des bords incisifs et sur les faces proximales des prismes. Cette discontinuité entre émail prismatique et interprismatique définit la gaine du prisme (Hu et al., 1997). Cette gaine a deux fonctions mécaniques très importantes. Tout d'abord, elle définit des plans de clivage tridimensionnels qui vont permettre de dévier les fissures (Boyde, 1997; White et al., 2001). Cela empêche ainsi les fissures d'avancer en profondeur à travers l'émail et évite des fractures macromécaniques ; les fissures se propagent ainsi latéralement sur un plus grand volume. Ensuite, la présence de quantités infimes de résidus de protéines autorise un mouvement de glissement différentiel limité entre les prismes adjacents (He and Swain, 2008) ce qui permet également de réduire les contraintes sans progression d'éventuelles fissures. Les composants mineurs de l'émail mature, à savoir les restes de protéines (améloblastine et TRAP essentiellement) et l'eau, ont un effet « plastifiant » ce qui rend l'émail beaucoup plus souple et plus flexible que son composant principal, l'hydroxyapatite (White et al., 2001; Xu et al., 1998).

4. Caractéristiques structurelles et organisationnelles de l'émail

a. Stries de Retzius

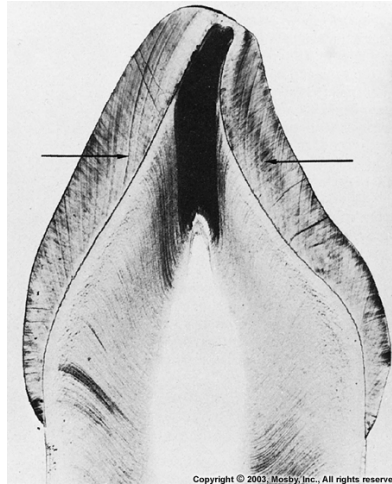


Figure 23 : Coupe longitudinale montrant la disposition des stries Retzius (Nanci, 2003).

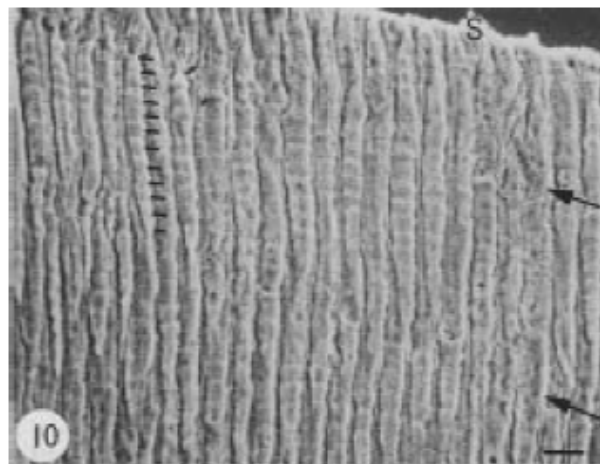


Figure 24 : Coupe transversale d'émail humain mordancé (acide nitrique). Environ 11 prismes d'émail peuvent être comptés entre deux stries de Retzius (flèches). S : surface de l'émail (Risnes, 1998).

Les stries de Retzius sont des lignes sombres visibles sur des coupes longitudinales de dents matures allant de la jonction amélo-dentinaire à la surface de la dent (Figure 23).

Il semblerait que ces stries représentent le rythme diurne de formation de l'émail. Un intervalle de répétition est discernable entre chaque strie de Retzius. Cet espace est identique pour toutes les dents d'un individu, mais variable entre et au sein d'une espèce (Figure 24).

b. Périkyميات

Les périkyميات correspondent à l'abouchement des stries de Retzius à la surface de la dent en coupe longitudinale où elles forment un sillon ou rainure (Figure 25). Elles sont absentes au niveau des cuspides et leur nombre augmente en direction cervicale. Sur les dents temporaires, les périkyميات sont beaucoup plus rares que sur les dents permanentes en raison du moindre nombre de stries de Retzius.

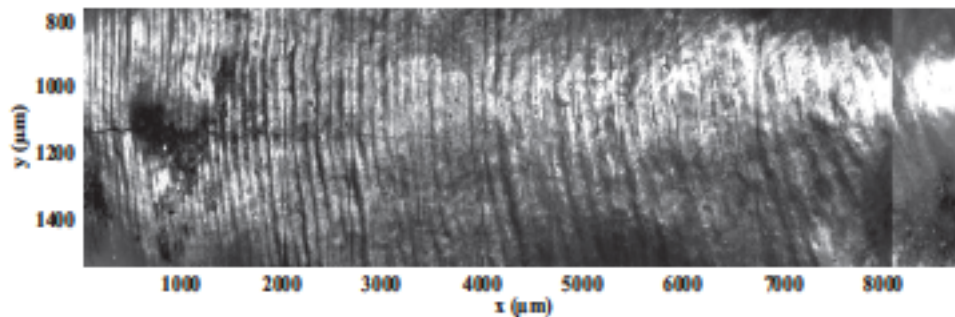


Figure 25 : Reconstruction 2D montrant l'organisation et la périodicité des périkyميات au niveau de la surface de l'incisive centrale inférieure permanente droite de KB5223, un hominidé fossile de Kromdraai B (Afrique du Sud) (Elhechmi et al., 2013).

La périodicité des stries transversales et de Retzius associée à la périodicité des périkyميات, sont utilisées pour estimer le taux et la chronologie du développement dentaire chez les hominidés (Risnes, 1998).

c. Stries transversales

L'émail humain se forme à une vitesse d'environ $4\mu\text{m}$ par jour et des stries transversales sont observées sur des coupes d'émail tous les $4\mu\text{m}$ environ le long des prismes. Ces stries pourraient donc correspondre au rythme circadien de formation des prismes d'émail. Cependant, lorsque l'on observe les surfaces amélares en microscopie électronique à balayage, ces stries semblent correspondre en réalité à des dépressions le long des prismes d'émail (Nanci, 2003).

d. Bandes de Hunter et Schreger

Les bandes de Hunter et Schreger correspondent au mouvement des améloblastes au fur et à mesure de la formation de l'émail et sont le résultat des changements d'orientation de groupes

adjacents de cristaux. La surface d'émail présente au niveau de la face occlusale étant supérieure à celle présente au niveau de la jonction amélo-dentinaire, les améloblastes vont suivre un mouvement oblique et circulaire (Figure 26).

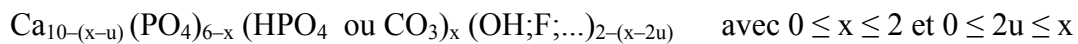


Figure 26 : Vue en microscopie électronique à balayage d'une coupe tangentielle d'émail montrant le motif circulaire des bandes de Hunter et Schreger le long de l'axe longitudinal de la cuspide (Skobe and Stern, 1980).

5. Les phosphates de calcium

a. Composition et phases minérales

Toutes les minéralisations biologiques à base de phosphate de calcium peuvent être représentées par la formule chimique suivante :



dans laquelle il existe des lacunes cationiques ($x - u$) et des lacunes anioniques ($x - 2u$) sur les sites monovalents. Le paramètre u est généralement très faible et peut être négligé dans le cas des apatites biologiques. Des études détaillées mettent en évidence l'existence de différents types de carbonate sur les sites anioniques (trivalent et monovalent) de la maille apatitique et il est établi que la teneur en carbonate dans le minéral osseux croît avec l'âge des vertébrés. Pour l'os et la dentine, la proportion de lacunes cationiques est très élevée et proche du maximum. Dans le cas de l'émail dentaire, au contraire, les proportions de lacunes et le taux

d'anions bivalents sont beaucoup plus faibles, avec une proportion plus importante d'ions carbonate sur les sites anioniques monovalents. Toutefois, les apatites biologiques sont spécifiques de par leur capacité à échanger certains ions au niveau de la surface minérale. Cette caractéristique est attribuée à l'existence d'un précurseur, généralement un phosphate de calcium amorphe (ACP), qui évolue progressivement vers une phase apatitique (HAP) (Cazalbou et al., 2004) (Figure 27).

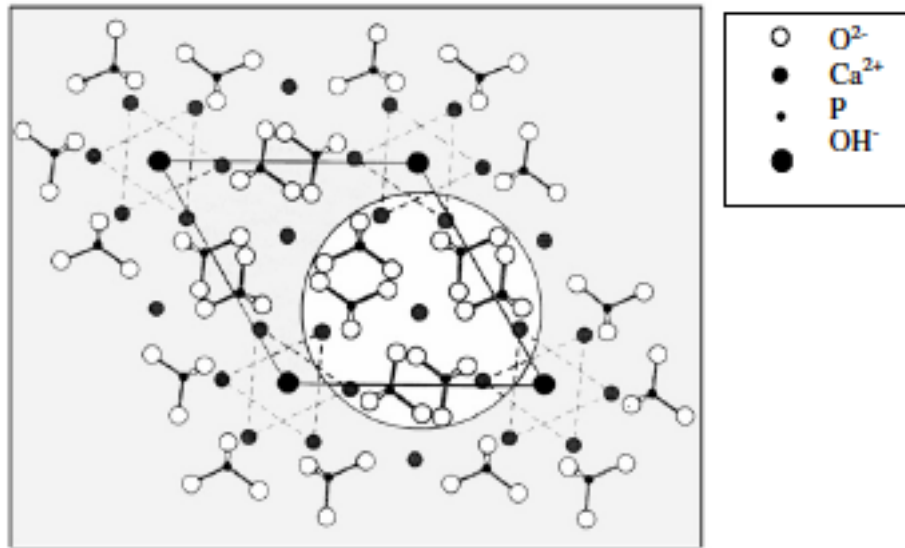


Figure 27 : Structure du phosphate de calcium amorphe. Modèle original de l'agrégat de Posner montrant la relation de l'ACP avec l'hydroxyapatite (Combes and Rey, 2010).

La formation d'une phase minérale de phosphate de calcium *in vitro* et *in vivo* nécessite un état de sursaturation. Le degré de sursaturation (DS) peut être défini comme le rapport entre le produit de l'activité ionique moyenne pour une phase minérale donnée en solution, et la constante thermodynamique de son produit de solubilité (par exemple, la K_{SP-HA}).

L'activité d'un ion en solution (Xi^z) est égale au produit de la concentration de l'ion $[Xi^z]$ et un coefficient d'activité ionique (ai) qui est une fonction de la taille de l'ion, de sa charge, de la force ionique et de la température ($(Xi^z) = ai \times [Xi^z]$).

La sursaturation des différentes phases de phosphates de calcium rencontrées dans l'émail est décrite par les équations (1) pour l'hydroxyapatite (HAP: $Ca_5OH(PO_4)_3$), (2) pour le phosphate d'octacalcium [OCP: $Ca_8H(PO_4)_6$] et (3) pour le phosphate dicalcique dihydraté (DCPD: $CaHPO_4 \cdot 2H_2O$) où Ca_f^{2+} est le calcium libre :

$$DS_{HA} = [(Ca_f^{2+})^5 (OH^-) (PO_4^{3-})^3]^{1/9} / K_{SP-HA} \quad (1)$$

$$DS_{OCP} = [(Ca_f^{2+})^4 (H^+) (PO_4^{3-})^3]^{1/8} / K_{SP-OCP} \quad (2)$$

$$DS_{DCPD} = [(Ca_f^{2+}) (HPO_4^{2-})]^{1/2} / K_{SP-DCPD} \quad (3)$$

En ce qui concerne le processus de minéralisation, une solution donnée peut être sursaturé en plus d'une phase de phosphate de calcium en même temps. Cependant, la phase la plus soluble se forme d'abord et ensuite, à travers une série de transformations de phases, va se convertir en HAP qui est la phase de phosphate de calcium la plus stable d'un point de vue thermodynamique. Cette formation du minéral par transformation de phase a été confirmée *in vitro* au niveau de l'émail (Habraken et al., 2013) et les étapes seraient les suivantes : ACP → DCPD → OCP → HAP. Cependant, les différentes formes de protéines de la matrice peuvent considérablement influencer le processus de transformation de phase, et il apparaît que la morphologie et l'organisation des cristaux d'émail sont fixées par la matrice de l'émail avant même la transformation de l'ACP en HAP (Beniash et al., 2009; Margolis et al., 2014; Robinson, 2007).

Dans l'émail dentaire, qui doit résister à l'abrasion et aux attaques acides, la fraction minérale croît progressivement aux dépens de la matrice organique, qui organise et contrôle sa croissance. Parallèlement, la taille des cristaux augmente considérablement et leur composition s'écarte de celle du minéral osseux et des premiers cristaux. Notamment, le nombre de lacunes cationiques diminue, accroissant ainsi la cohésion cristalline et la stabilité de la structure. À la fin de sa formation, l'émail est constitué de cristaux aciculaires orientés parallèlement. L'axe *c* de la maille hexagonale de l'apatite est perpendiculaire à la surface de l'émail (Figure 28). Cette direction, qui correspond à la vitesse de croissance maximale des cristaux d'apatite, facilite certainement la reminéralisation de l'émail par la salive.

Les altérations profondes du minéral étant toujours liées à la présence d'eau, on peut penser qu'elles dépendent notamment de la porosité des tissus. Il est ainsi généralement considéré que l'émail dentaire, en raison de la taille des cristallites d'apatite et de sa faible porosité, évolue peu.

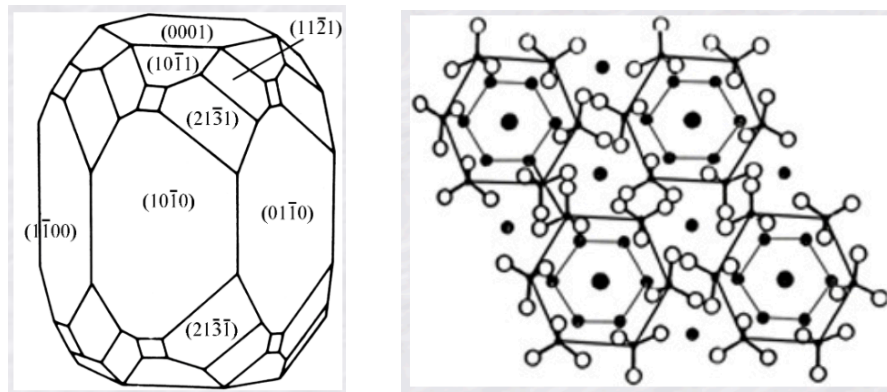


Figure 28 : Structure morphologique d'un cristal d'hydroxyapatite (avec les indices de Miller) et projection 2D de la face 001 du cristal (de (web.mit.edu)).

b. Imagerie des apatites

L'une des caractéristiques essentielles des nanocristaux d'apatite fraîchement formés, quelle que soit leur origine (biologique ou synthétique), est la présence d'environnements ioniques spécifiques des ions minéraux, détectables par diverses méthodes spectroscopiques telles que la spectroscopie infrarouge (IR), la spectroscopie par résonance magnétique nucléaire (RMN) ou la spectroscopie d'absorption des rayons X (XANES). Toutes ces méthodes mettent en évidence, en plus de l'existence d'environnements ioniques majoritaires caractéristiques de la structure apatitique (PO_4^{3-}), d'autres types d'environnements ioniques qui sont détectables uniquement dans les nanocristaux. Ces environnements ioniques particuliers sont appelés «environnements non apatitiques». Ils ont été associés à des couches ioniques hydratées de surface, particulièrement abondantes dans les nanocristaux d'apatite fraîchement précipités.

i. Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FT-IR)

1. Principe du FT-IR

La spectroscopie infrarouge exploite le fait que les molécules possèdent des fréquences spécifiques pour lesquelles elles tournent ou vibrent en correspondance avec des niveaux d'énergie spécifiques. La fréquence des vibrations peut alors être associée à une liaison particulière. Le spectre infrarouge d'un échantillon est établi en faisant passer un faisceau d'infrarouge moyen (4000 à 400 cm^{-1}) au travers de cette structure. L'examen de la lumière transmise indique la quantité d'énergie absorbée à chaque longueur d'onde. La spectroscopie à transformée de Fourier permet de mesurer toutes les fréquences simultanément. Des spectres en absorbance ou en transmittance peuvent alors être produits. L'analyse de ces caractéristiques indique des détails de la structure moléculaire de l'échantillon (Figure 29).

Peak (cm ⁻¹)	Assignment
3572 (w)	Stretching mode, $\nu_{s'}$, of the hydroxyl group
2070 (w)	Harmonic overtone or combination band
2000 (w)	Harmonic overtone $2 \cdot \nu_3$ or combination band $\nu_1 + \nu_{3b}$
1154 (w)	Harmonic overtone or combination band
1087 (s)	Triply degenerated asymmetric stretching mode, $\nu_{3a'}$, of the P–O bond of the phosphate group
1046 (s)	Triply degenerated asymmetric stretching mode, $\nu_{3b'}$, of the P–O bond of the phosphate group
1032 (sh)	Triply degenerated asymmetric stretching mode, $\nu_{3c'}$, of the P–O bond of the phosphate group
962 (w)	Nondegenerated symmetric stretching mode, ν_1 , of the P–O bonds of the phosphate group
631 (m)	Librational mode, ν_L , of the hydroxyl group
602 (s,shp)	Triply degenerated bending mode, $\nu_{4a'}$, of the O–P–O bonds of the phosphate group
574 (s,sh)	Triply degenerated bending mode, $\nu_{4b'}$, of the O–P–O bonds of the phosphate group
561 (s)	Triply degenerated bending mode, $\nu_{4c'}$, of the O–P–O bonds of the phosphate group
472 (w)	Double degenerated bending mode, $\nu_{2a'}$, of the O–P–O bonds of the phosphate group
462 (w,sh)	Double degenerated bending mode, $\nu_{2b'}$, of the O–P–O bonds of the phosphate group
361 (w,sh)	HAP lattice vibration mode or combination band, $\nu_1 - \nu_4$
355 (sh)	Translational mode, ν_T , of the hydroxyl group (ν_3)
342 (w,sh)	Translational mode, ν_T , of the hydroxyl group (ν_3)

Figure 29 : Longueurs d'ondes caractéristiques correspondant aux pics de l'hydroxyapatite w : faible, m : moyen, s : fort, sh : épaulement, shp : aigu. (Koutsopoulos, 2002)

2. Spectres caractéristiques

Pour l'ACP on remarquera une large bande caractéristique au niveau des bandes ν_1 et ν_3 de PO_4^{3-} (900 à 1200 cm⁻¹). Pour l'HAP, des pics très marqués au niveau des bandes ν_1 et ν_3 de PO_4^{3-} (Gadaleta et al., 1996) (Figure 30)

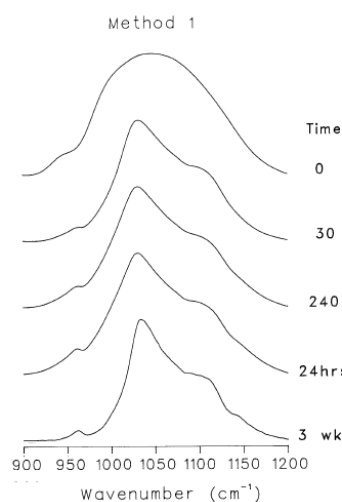


Figure 30 : Spectres caractéristiques de l'ACP par FT-IR (Time 0) puis de sa conversion progressive en HAP (30min – 3 semaines) (Gadaleta et al., 1996).

ii. *Microscopie électronique à transmission et diffraction électronique*

1. Principe

Un faisceau d'électrons va traverser l'échantillon puis être projeté sur un écran fluorescent par un système de lentilles magnétiques. L'écran fluorescent va alors transformer l'image électronique en image optique. Il existe deux modes :

- le mode image : le détecteur est placé dans le plan de l'image. Un diaphragme d'objectif est placé dans le plan focal de manière à sélectionner uniquement le faisceau transmis en ligne droite par l'échantillon. Ce sont donc uniquement les électrons non-diffractés qui formeront l'image sur l'écran.
- le mode diffraction : le détecteur est placé dans le plan focal du faisceau. Lorsque le faisceau traverse un échantillon cristallographique, il est diffracté en plusieurs petits faisceaux qui, grâce aux lentilles magnétiques, se recombinent pour former l'image. On peut ainsi visualiser les directions dans lesquelles vont les électrons et ainsi caractériser les cristaux (organisation des atomes, orientation, ...).

2. Indices de Miller pour l'hydroxyapatite

Cet indice va permettre de reconnaître quelle face du cristal réfléchit les électrons reçus et va ainsi fournir une information sur la structure et l'orientation tridimensionnelle du minéral analysé. La mesure de la distance entre le centre du faisceau et le point de diffraction multipliée par la constante de diffraction du microscope donnera une distance (d (Å)) correspondant aux différents indices de Miller et donc aux faces de la maille cristalline correspondante (Figure 31).

Data from the X-Ray Diffraction Pattern				A.S.T.M. Card No. 9-432		
$2 \cdot \theta$ (°)	I/I_1 %	d (Å)	Miller Index of the Corresponding Reflection	I/I_1 %	d (Å)	Miller Index of the Corresponding Reflection
16.84	11	5.26	(101)	5	5.250	(101)
18.78	10	4.72	(110)	3	4.720	(110)
21.60	14	4.10	(200)	9	4.070	(200)
22.97	12	3.87	(111)	9	3.880	(111)
				1	3.510	(201)
25.90	42	3.44	(002)	40	3.440	(002)
28.22	18	3.16	(102)	11	3.170	(102)
29.14	23	3.06	(210)	17	3.080	(210)
31.86	100	2.80	(211)	100	2.814	(211)
32.20	65	2.78	(112)	60	2.778	(112)
32.90	65	2.72	(300)	60	2.720	(300)
34.22	30	2.62	(202)	25	2.631	(202)
35.51	11	2.52	(301)	5	2.528	(301)
39.26	13	2.28	(212)	7	2.296	(212)
39.86	29	2.26	(310)	20	2.262	(310)
				1	2.228	(221)
42.10	15	2.14	(311)	9	2.148	(311)
				3	2.134	(302)
43.80	13	2.07	(113)	7	2.065	(113)
				1	2.040	(400)
45.32	11	1.99	(203)	5	2.000	(203)
46.69	49	1.94	(222)	30	1.943	(222)
48.16	23	1.88	(312)	15	1.890	(312)
48.59	9	1.87	(320)	5	1.871	(320)
49.51	45	1.83	(213)	40	1.841	(213)
50.53	26	1.80	(321)	20	1.806	(321)
51.33	14	1.78	(410)	11	1.780	(410)
52.24	18	1.75	(402), (303)	15	1.754	(402), (303)
53.27	23	1.72	(004), (411)	20	1.722	(004), (411)
54.45	6	1.68	(104)	3	1.684	(104)
55.87	11	1.64	(322), (223)	9	1.644	(322), (223)
57.15	9	1.61	(313)	7	1.611	(313)
58.17	6	1.58	(501), (204)	3	1.587	(501), (204)
60.01	9	1.54	(420)	5	1.542	(420)
60.45	9	1.53	(331)	5	1.530	(331)
61.66	13	1.50	(214), (421)	9	1.503	(214), (421)
63.07	15	1.47	(502)	11	1.474	(502)
				3	1.465	(510)
63.96	19	1.45	(304), (323)			
64.92	16	1.43	(511)			
66.30	5	1.40	(422)			

Figure 31 : Indices de Miller et distances correspondantes pour l'HAP (Koutsopoulos, 2002).

Chapitre 3 : Résultats

I. Projet de recherche : objectifs du travail

Comme nous l'avons exposé dans le chapitre 2.I.1 – amélogénine ; l'amélogénine a une forme allongée lorsqu'elle est sécrétée et plusieurs molécules vont ensuite pouvoir s'assembler pour former des nanosphères qui vont elles-mêmes s'aligner en formant des chaînes et guider ainsi la formation des cristaux d'HAP de l'émail. La présence de l'extrémité C-terminale de la molécule a été montrée comme indispensable à la formation de ces nanosphères dans des conditions environnementales spécifiques de pH, température, concentration en ions calcium et chlorure ; ainsi qu'à la liaison de la protéine à l'HAP.

LRAP est composé exclusivement des extrémités actives N- et C-terminales de la forme complète de l'amélogénine. Il a été montré que LRAP avait la capacité de former des nanosphères (Habelitz et al., 2006) et que le peptide se liait à l'HAP au niveau de son extrémité C-terminale comme la protéine complète (Shaw et al., 2004) *in vitro*. Nous avons donc cherché à comprendre si ce petit peptide présentait les mêmes capacités d'auto-assemblage en nanochaînes que son homologue de pleine longueur et si cette capacité lui conférait également des propriétés morphogéniques sur les cristaux d'hydroxyapatite en formation. Ce travail de recherche a fait l'objet des trois premières publications.

Par ailleurs, il a également été montré que LRAP avait un rôle de molécule de signalisation et permettait une activation de la transcription d'amélogénine par l'améloblaste (Jacob and Veis, 2008). Nous avons voulu étudier l'effet de LRAP sur la différenciation de l'améloblaste et vérifier dans des modèles biologiques nos observations précédentes sur la minéralisation à l'aide de deux modèles de culture cellulaire (le premier correspondant au stade d'améloblaste sécréteur et le second au stade d'améloblaste mature) et un modèle de culture de germes de molaire correspondant à l'améloblaste sécréteur. Ce travail de recherche a fait l'objet de la dernière publication qui est en cours de soumission.

II. Rôle de l'extrémité N-terminale dans la régulation de la formation du phosphate de calcium *in vitro*

1. Contexte et question posée

Les domaines N-terminaux et C-terminaux de l'amélogénine sont essentiels pour la formation correcte de l'email. Des études récentes ont également suggéré que, bien que l'extrémité C-terminale joue un rôle apparent dans les interactions protéine-minéraux, d'autres domaines structuraux de l'amélogénine sont impliqués. Les travaux de Kwak (Kwak et al., 2009) ont ainsi montré que P148, la forme clivée de l'amélogénine porcine P173 à qui il manque les 25 acides aminés C-terminaux, est un stabilisateur efficace de l'ACP ; alors que rP147 dans laquelle il manque le groupement phosphate et l'extrémité C-terminale n'a que peu d'influence sur la nature du minéral en formation.

L'objectif de ce travail a donc été d'explorer le rôle de l'extrémité N-terminale de l'amélogénine dans la régulation de la formation de phosphate de calcium *in vitro*. Pour ce faire, nous avons réalisé des études de minéralisation spontanée en utilisant les formes phosphorylée (+P) et non-phosphorylée (-P) de l'extrémité N-terminale du Leucine-Rich Amelogenin Peptide (LRAP) qui n'a donc pas le domaine hydrophile C-terminal (LRAP-CT). L'évolution de la minéralisation a été suivie par les changements de pH de la solution. Les phases minérales formées ont été caractérisées par MET, par diffraction électronique et FT-IR.

2. Matériel et méthodes

a. Préparation des solutions de protéines et de minéraux

Les différentes formes de LRAP utilisées dans cette étude ont été synthétisées puis purifiées selon la technique décrite par Ryu et coll. (Ryu et al., 1996) en collaboration avec l'équipe de Yamakoshi et Simmer (University of Michigan, School of dentistry, Ann Arbor, MI, USA). Les tampons utilisés dans cette technique étant acides (pH~3,9), le pH des solutions stock de protéines obtenues après dilution de la protéine lyophilisée dans de l'eau déminéralisée dé-ionisée (DDW) est également acide ($3,0 < \text{pH} < 3,3$ selon les différentes formes de protéines).

Les protéines lyophilisées ont été pesées puis dissoutes dans de l'eau DDW afin d'obtenir une concentration de protéines comprises entre 5mg/mL et 1,75mg/mL. Ces solutions ont été conservées pendant 24h à 4°C afin de permettre une dissolution complète de la protéine, ce qui a ensuite été confirmé par Dynamic Light Scattering (DLS). Ces solutions ont ensuite été diluées à nouveau pour préparer des échantillons ayant une concentration finale de protéine de 2mg/mL à 0,175mg/mL.

P173:	MPLPPHPGHPGYINF ^{S^P} YEVLTPLKQYQNMIRHP-#-SLLPDLP <u>LEAWPATDKTKREEVD</u> <i>Domaine hydrophile</i>
LRAP :	MPLPPHPGHPGYINF ^{S^P} YEVLTPLKQYQNMIRHPSLLPDLP <u>LEAWPATDKTKREEVD</u>
LRAP(+P)-CT:	MPLPPHPGHPGYINF ^{S^P} YEVLTPLKQYQNMIRHPSLLPDLP-----
LRAP(-P)-CT:	MPLPPHPGHPGYINF ^S YEVLTPLKQYQNMIRHPSLLPDLP-----
#: Domaine hydrophobe central de 117 acides aminés	

Figure 32 : Différentes formes d'amélogénine utilisées

Des solutions de calcium (30mM) et de phosphate (3mM) ont été préparées en utilisant les agents réactifs CaCl₂ (Sigma, >99,0% pureté) et KH₂PO₄ (Sigma, >99,0% pureté). Les solutions de KH₂PO₄ ont été ajustées à un pH allant de 7,6-11,4 à 25°C avec de faibles volumes de KOH concentré (1N). Le pH auquel la solution de phosphate a été ajusté a été choisi afin que le pH initial de la solution (comprenant les protéines) utilisée dans les expériences de minéralisation ait une valeur de pH=7,4 à 37°C après avoir mélangé tous les composants. A l'exception des solutions de protéines, toutes les solutions ont été filtrées (0,22 µm) avant leur utilisation.

b. Préparation des échantillons pour les études de minéralisation

Des échantillons de solutions de calcium et de phosphate (pH pré-ajusté) ont été ajoutés, à température ambiante, à la solution de protéine préalablement centrifugée. Les échantillons ont ensuite été placés dans bain réglé à 37°C. Le pH des échantillons a alors été ajusté à l'aide de faibles quantités de KOH afin d'obtenir un pH de 7,4 et des concentrations finales de 2,5mM Ca, 1,5mM P et 2mg/mL à 0,175mg/mL de protéine, avec un volume final de 0,06mL. Le pH de chaque échantillon a été suivi et enregistré à l'aide d'une micro électrode de pH (MI-410, Microelectrodes Inc., Bedford, NH) immergée dans la solution. Le pH a été enregistré à l'aide du logiciel Orion (Orion Research Inc.).

c. Préparation des échantillons pour le FT-IR

A la suite des expériences de minéralisation, les échantillons (à 24h) de solutions de protéines et de minéraux précipités ont été centrifugés et la partie en suspension a été éliminée afin de concentrer l'échantillon en 45µL. Ce nouvel échantillon a ensuite été déposé sur la fenêtre en bromure de potassium (KBr) des cartes de FT-IR (KBr IR Card, International Crystal Labs, Garfield, NJ) puis séché à l'air. Les spectres FT-IR (4000-450 cm⁻¹) des échantillons ont été enregistrés avec un microscope FT-IR multiscope (Perkin-Elmer) afin d'analyser la phase des minéraux observés.

d. Préparation des échantillons pour le MET

Des échantillons de 5µL ont été prélevés à des temps prédéfinis lors des expériences de minéralisation. Ces échantillons ont été placés sur des grilles de cuivre recouverte de carbone (Electron Microscopy Science, Hatfield, PA), les grilles ont ensuite été apposées verticalement contre un papier buvard, rincées par immersion dans de l'eau DDW, apposées contre le buvard de nouveau puis séchées à l'air. Les grilles ont été préparées en duplica. Les images ont été obtenues en mode image en champ clair ou en mode de diffraction : SAED (Selected Area Electron Diffraction) à l'aide d'un microscope électronique à transmission (JEOL 1200 à 100kV) et d'une caméra (CCD AMT, Danvers, MA). Les images ont ensuite été analysées à l'aide du logiciel ImageJ 1.43u (National Institute of Health, USA). La luminosité et le contraste de certaines images de minéralisation ont été ajustés à l'aide du logiciel Photoshop version 6.0 (Adobe System Inc.) afin d'améliorer la visibilité des structures.

3. Résultats et discussion

Dans cette étude, nous avons montré que LRAP(+P)-CT est un stabilisateur efficace de l'ACP, empêchant sa transformation en cristaux apatitiques, ce qui avait déjà été montré pour P148, la forme clivée de l'amélogénine porcine P173 à qui il manque les 25 acides aminés C-terminaux (Kwak et al., 2009). En revanche, l'addition de LRAP(-P)-CT semble avoir peu d'influence sur la nature du minéral en formation, bien que ce processus soit accéléré en présence du peptide. Une observation similaire a déjà été obtenue en utilisant rP147 à qui il manque également le groupement phosphate et l'extrémité C-terminale hydrophile (Kwak et al., 2009).

Nos résultats indiquent donc que le domaine N-terminal seul, présent dans LRAP comme dans les formes de plus haut poids moléculaire de l'amélogénine, a la capacité d'interagir avec le phosphate de calcium en formant différentes phases minérales. Ces résultats sont cohérents avec des études de RMN qui indiquent que les régions N-terminales de LRAP (phosphorylée et non phosphorylée), en plus de l'extrémité C-terminale, sont impliquées dans la liaison à l'hydroxyapatite (Shaw and Ferris, 2008; Shaw et al., 2004).

Par conséquent, il est possible que le domaine N-terminal joue un rôle dans la régulation de la formation initiale des particules d'ACP observées dans l'émail en développement (Beniash et al., 2009). D'autres molécules associées à des processus de biominéralisation, comme l'ostéopontine hautement phosphorylée (Gericke et al., 2005) et le domaine N-terminal de la protéine de la matrice dentinaire (DMP-1) (Gajjeraman et al., 2007), ont également été montrées comme stabilisant l'ACP.

Ces différentes observations pourraient favoriser le développement de nouvelles approches biomimétiques pour la régénération de l'émail. Des phosphates de calcium amorphes se transformant en structures minérales plus stables on d'ailleurs déjà été utilisés pour la composition de nouveaux biomatériaux (Aizenberg et al., 2003).

L'article est téléchargeable avec la référence suivante :

Cells Tissues Organs. 2011;194(2-4):188-93. doi: 10.1159/000324827. Epub 2011 May 13

III. Le Leucine Rich Amelogenin Peptide régule la minéralisation *in vitro*

1. Contexte et question posée

La capacité de l'amélogénine à réguler la formation de l'émail est liée à la présence de ses domaines hautement conservés N- et C-terminaux, sa capacité d'auto-assemblage, et sa capacité à stabiliser le phosphate de calcium amorphe (ACP) - une capacité accrue par la phosphorylation de l'amélogénine. Différents travaux ont montré que la capacité de l'amélogénine à former des nanosphères et des nanochaînes était dépendante de son environnement (pH, température, force ionique). Ainsi, les différentes formes d'amélogénines s'assemblent à des pH spécifiques *in vitro* proches de leurs points isoélectriques, mais seule la forme complète a la capacité de former des nanochaînes (Wiedemann-Bidlack et al., 2007, 2011). De plus, alors que l'état de phosphorylation de la molécule semble n'avoir qu'un effet subtil sur la formation des nanochaînes, il paraît avoir un effet déterminant sur la formation du phosphate de calcium (Kwak et al., 2009).

Dans cette partie du travail, nous voulons évaluer le rôle de la phosphorylation du peptide sur la formation des chaînes et des cristaux en utilisant des variants phosphorylés ou non du Leucine-Rich Amelogenin Peptide (LRAP). Les capacités d'auto-assemblage du peptide ont été étudiées par Dynamic Light Scattering (DLS) et microscopie électronique à transmission (MET). La diffraction électronique en MET (SAED) et la spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FT-IR) ont également été utilisées pour déterminer l'effet des formes phosphorylées et non phosphorylées de LRAP sur la formation de phosphates de calcium.

2. Matériel et méthodes

a. Préparation des protéines

Les différentes formes de LRAP utilisées dans cette étude ont été synthétisées comme mentionné précédemment. Les tampons utilisés dans cette technique étant acides (pH~3,9), le pH des solutions stock de protéines obtenues après dilution de la protéine lyophilisée dans de l'eau déminéralisée dé-ionisée (DDW) est également acide ($3,0 < \text{pH} < 3,3$ selon les différentes formes de protéines).

P173:	MPLPPHPGHPGYINF^{S^P}YEVLTPLKWYQNMIRHPYTSYGYEPMGGWLHHQIIPVVSQQT PQSHALQPHHIPMVPAQQPGIPQQPMMPLPGQHSMTPTQHHQPNLPLPAQQPFQPPQ VQPQPHQPLQPQSPMHPIQPLLQPPLPPLPPMFSMQ SLLPDLPLEAWPATDKTKREEVD <i>Domaine hydrophile</i>
LRAP(+P):	MPLPPHPGHPGYINF^{S^P}YEVLTPLKWYQNMIRHPSLLPDLPLEAWPATDKTKREEVD
LRAP(-P):	MPLPPHPGHPGYINFSYEVLTPLKWYQNMIRHPSLLPDLPLEAWPATDKTKREEVD
LRAP(+P,-CT):	MPLPPHPGHPGYINF^{S^P}YEVLTPLKWYQNMIRHPSLLPDL-----
LRAP(-P,-CT):	MPLPPHPGHPGYINFSYEVLTPLKWYQNMIRHPSLLPDL-----

Figure 33 : Compositions en acides aminés des différentes formes de LRAP utilisées

b. Préparation des solutions de protéine, de minéraux et de tampons

Les protéines lyophilisées ont été pesées puis dissoutes dans de l'eau DDW afin d'obtenir une concentration de protéines de 5mg/mL à 1,75mg/mL. Ces solutions ont été conservées pendant 24h à 4°C afin de permettre une dissolution complète de la protéine, ce qui a ensuite été confirmé par Dynamic Light Scattering (DLS). Ces solutions ont ensuite été diluées à nouveau pour préparer des échantillons ayant une concentration finale de protéine de 2mg/mL à 0,175mg/mL. Avant leur utilisation pour les mesures par DLS ou dans les expériences de minéralisation les solutions stock de protéines ont été centrifugées (10500g) pendant 20 minutes à 4°C. Des solutions de tampon MOPS et MES (Sigma-Aldrich) ont été préparées à température ambiante à une concentration de 50mM afin de modifier, au minimum, la force ionique de l'échantillon final. Le pH de la solution de MES n'a pas été ajusté avant son utilisation. Des solutions de calcium (30mM) et de phosphate (3mM) ont été préparées en utilisant les agents réactifs CaCl₂ (Sigma, >99,0% pureté) et KH₂PO₄ (Sigma, >99,0% pureté). Les solutions de MOPS et de KH₂PO₄ ont été ajustées à un pH allant de 6,5-7,5 à 25°C pour le MOPS et 7,6-11,4 à 25°C pour KH₂PO₄ avec de faibles volumes de KOH concentré (1N). Le pH auquel la solution de phosphate a été ajusté a été choisi afin que le pH initial de la solution (comprenant les protéines) utilisée dans les expériences de minéralisation ait une valeur de pH=7,4 à 37°C après avoir mélangé tous les composants. A l'exception des solutions de protéines, toutes les solutions ont été filtrées (0,22 µm) avant leur utilisation.

c. Analyses par Dynamic Light Scattering (DLS)

i. Principe du DLS

Le DLS est utilisé pour déterminer les différentes tailles de petites particules en solution. Lorsque la lumière interagit avec une molécule isolée, la lumière est diffusée dans toutes les directions (diffusion de Rayleigh) avec une fréquence équivalente à celle du rayon incident. Si la source de lumière est un laser, donc monochromatique et constante, des fluctuations de l'intensité de diffusion dans le temps vont pouvoir être observées. Ces fluctuations se produisent car la solution de particules n'est pas figée dans l'espace mais se déplace aléatoirement selon le mouvement Brownien. L'intensité de diffusion mesurée au niveau du détecteur correspond à la somme de la diffusion de toutes les particules. Au fur et à mesure que les particules se déplacent, la phase de la lumière diffusée par chaque particule varie, entraînant des interférences constructrices ou destructrices et des fluctuations dans la somme des intensités mesurées par le détecteur. La technique mathématique utilisée pour déterminer la fréquence du spectre de ce signal est l'auto-corrélation ; cette technique est utilisée dans le DLS pour mesurer le coefficient de diffusion translationnelle des particules. Les coefficients d'auto-corrélation sont exportés par le logiciel DynaPro comme une série d'intégrales avec l'intensité d'auto-corrélation $G(t)$: $G(t) = 1 + \exp(-\Gamma t)$. La constante de désintégration (Γ), $\Gamma = 2Dq^2 = 2D [(4\pi n/\lambda_0) \cdot \sin(\theta/2)]^2$ représente les propriétés de diffusion des particules observées; avec D le coefficient de diffusion translationnelle, q le vecteur de diffusion, n l'index de réfraction du solvant, λ_0 la longueur d'onde sous vide de la lumière incidente et θ l'angle de diffusion. L'évaluation de Γ permet de connaître le coefficient de diffusion des particules (D) qui permet de calculer le rayon hydrodynamique (R_H) grâce à l'équation de Stokes Einstein suivante, où k est la constante de Boltzmann, T la température et la η viscosité du solvant : $R_H = kT / 6\pi\eta D$

ii. Préparation des échantillons

Les échantillons de solutions de protéines ont été centrifugés comme mentionné précédemment avant chaque expérience de DLS. Les solutions de MES, pour les expériences allant de pH 5,0-6,5 et MOPS, pour les pH 6,5-10,0 ont été conservées à température ambiante puis ajoutées aux solutions de protéines afin d'obtenir une concentration finale de tampon de 20mM. Les solutions de calcium ont été ajoutées lorsque cela était nécessaire à une concentration finale de CaCl_2 de 2,5mM. Le pH des solutions a ensuite été ajusté au pH souhaité à l'aide de KOH et d'eau DDW, afin d'obtenir les concentrations finales des

différents composants (2mg/mL de protéine, 20mM de tampon et 2,5mM de calcium). La concentration finale de protéine de 2mg/mL a été choisie car il a été montré que cette concentration était nécessaire afin d'obtenir une intensité de signal suffisante pour avoir des résultats de DLS fiables. Pour les expériences à 37°C, l'ajustement du pH a été réalisé dans un bain à température constante puis le transfert dans la cellule de DLS, préchauffée, a été réalisé dans une chambre chaude afin de maintenir l'échantillon à la bonne température avant de l'insérer dans la chambre de l'instrument (DLS) réglée à 37°C.

iii. Collecte des données

Les mesures ont été réalisées à l'aide d'un instrument de DLS (DynaPro MSXTC/12) muni d'une diode laser en gallium-arsenite avec une longueur d'onde d'émission de 825,2 nm et une puissance programmable. Une cuvette en quartz d'un volume de 12,5µL a été utilisée pour toutes les expériences. Les données de diffusion ont été collectées à un angle $\theta=90^\circ$ et analysées avec le programme DYNAMICS V6 version 6.3.40. Chaque expérience comprenait 8 mesures à 5 minutes d'intervalles, chacune composée de 20 acquisitions de 5s. La première mesure commençait 5 minutes après avoir inséré la cuvette dans la chambre du DLS. La formation d'agrégats de très grande taille ou de gel était indiquée par une très forte augmentation de l'intensité du signal jusqu'à des valeurs dépassant la limite de détection de l'instrument. Lorsque ce phénomène était observé, l'expérience était interrompue pendant environ deux heures afin de permettre aux agrégats de se dissocier, puis reprise. Si aucun changement dans l'intensité du signal n'était observé, la stabilité des agrégats était confirmée et l'expérience était alors arrêtée.

d. Préparation des échantillons pour les études de minéralisation

Des échantillons de solutions de calcium et de phosphate (pH pré-ajusté) ont été ajoutés, à température ambiante, à la solution de protéine préalablement centrifugée. Les échantillons ont ensuite été placés dans bain réglé à 37°C. Le pH des échantillons a alors été ajusté à l'aide de faibles quantités de KOH concentré afin d'obtenir un pH de 7,4 et des concentrations finales de 2,5mM Ca, 1,5mM P et 2mg/mL à 0,175mg/mL de protéine, avec un volume final de 0,06mL. Le pH de chaque échantillon a été suivi et enregistré à l'aide d'une micro électrode de pH (MI-410, Microelectrodes Inc., Bedford, NH) immergée dans la solution. Le pH a été enregistré à l'aide du logiciel Orion (Orion Research Inc.).

e. Analyses par Microscopie Electronique à Transmission (MET)

Des échantillons de 5µL ont été prélevés immédiatement après chaque expérience de DLS, et à des temps prédéfinis lors des expériences de minéralisation. Ces échantillons ont été placés sur des grilles de cuivre recouverte de carbone (Electron Microscopy Science, Hatfield, PA), les grilles ont ensuite été apposées verticalement contre un papier buvard, rincées par immersion dans de l'eau DDW, apposées contre le buvard de nouveau puis séchées à l'air. Les grilles ont été préparées en double ; les grilles correspondant aux expériences de DLS et certaines grilles correspondant aux expériences de minéralisation ont ensuite été traitées par coloration négative à l'acide phosphore-tungstique (PTA) dont le pH avait été préalablement ajusté pour qu'il soit équivalent à celui de l'échantillon (sauf pour des pH>7,2 car on observe une précipitation du PTA). Après 30 secondes de traitement au PTA, les grilles ont été apposées verticalement contre du papier buvard puis séchées à l'air. Les images ont été obtenues en mode image en champ clair ou en mode de diffraction : SAED (Selected Area Electron Diffraction) à l'aide d'un microscope électronique à transmission JEOL 1200 à 100kV et d'une caméra CCD AMT (AMT, Danvers, MA). Les images ont ensuite été analysées à l'aide du logiciel ImageJ 1.43u (National Institute of Health, USA). La luminosité et le contraste de certaines images de minéralisation ont été ajustés à l'aide du logiciel Photoshop version 6.0 (Adobe System Inc.) afin d'améliorer la visibilité des structures.

f. Analyses par Spectroscopie Infrarouge à Transformée de Fourier (FT-IR)

A la suite de certaines expériences de minéralisation, les échantillons à 24h ont été centrifugés et la partie en suspension a été éliminée afin de concentrer l'échantillon en 45µL. Ce nouvel échantillon a ensuite été déposé sur la fenêtre en bromure de potassium (KBr) des cartes de FT-IR (KBr IR Card, International Crystal Labs, Garfield, NJ) puis séché à l'air. Les spectres FT-IR (4000-450 cm⁻¹) des échantillons ont été enregistrés avec un microscope FT-IR multiscopes (Perkin-Elmer) afin d'analyser la phase des minéraux observés.

g. Analyses statistiques

Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel SigmaStat version 3.11 (Systat software, Inc.) à partir des valeurs mesurées avec le logiciel image J sur les images obtenues par MET. Les mesures ont été soumises à une analyse de variance ANOVA et un test comparaison de Holm-Sidak ($\alpha=0,05$; $P<0,001$).

3. Résultats et discussion

Les résultats obtenus montrent que LRAP présente de fortes similitudes avec la forme complète d'amélogénine, dans ses capacités d'auto-assemblage et ses effets sur la formation de phosphates de calcium *in vitro*. A pH neutre, LRAP(+P) et LRAP(-P) peuvent s'assembler pour former des structures en forme de chaîne composée de nanosphères, d'une manière similaire à celle observée pour l'amélogénine (Wiedemann-Bidlack et al., 2007, 2011). Nous avons également montré que l'addition de calcium a un effet inducteur majeur sur la formation de chaînes pour LRAP (+P) alors que son effet est beaucoup plus faible pour LRAP(-P). Cette observation est cohérente avec les résultats rapportés (Le et al., 2006), qui montrent que, bien que LRAP (-P) se lie au calcium, une telle liaison n'induit pas de changements de conformation importants dans la structure de la protéine. De plus, similairement à ce qui a été observé pour la forme complète d'amélogénine (Paine et al., 2003b; Wiedemann-Bidlack et al., 2007), LRAP perd sa capacité à assembler en structures de type chaînes lorsque les acides aminés C-terminaux sont absents, confirmant l'importance de l'extrémité C-terminale pour la formation d'assemblages hautement structurés (Paine et al., 2003b).

Nous avons également montré que la forme phosphorylée de LRAP, LRAP (+P), peut stabiliser les particules d'ACP *in vitro* et empêcher leur transformation en hydroxyapatite. Ces résultats sont similaires à ceux obtenus en utilisant toute l'amélogénine native (P173) (Wiedemann-Bidlack et al., 2011) et clivée (P148) (Kwak et al., 2009) et la forme clivée phosphorylée de LRAP (Le Norcy et al., 2011a). Ces résultats suggèrent un rôle important du groupement phosphate unique présent dans les amélogénines natives sur la régulation de la formation de cristaux *in vivo*. Cette hypothèse est compatible avec les résultats récents qui montrent la présence de formes d'ACP dans les phases initiales du développement de l'émail qui se transforment ensuite en cristaux apatitiques (Beniash et al., 2009).

Le LRAP non phosphorylé, LRAP(-P), semble guider la formation de faisceaux bien alignés de cristaux apatitiques en forme d'aiguilles. Cette capacité a été précédemment observée pour les amélogénines recombinantes de pleine longueur (rP172) de même que leur capacité à stabiliser transitoirement les nanoparticules d'ACP (Beniash et al., 2005; Kwak et al., 2009). LRAP (-P) pourrait donc guider la croissance des cristaux d'HAP le long de leur axe *c* au fur et à mesure que les peptides s'assemblent pour former des nanochaînes. En conclusion, nous avons montré que LRAP et ses variantes structurelles présentent de fortes similitudes de comportement avec les formes complètes et clivées de amélogénine. LRAP peut s'assembler

en chaînes de nanosphères et de réguler la minéralisation *in vitro*. Bien que son rôle dans la formation de l'émail *in vivo* n'est pas encore été élucidé, LRAP semble être un candidat idéal pour une utilisation dans les approches biomimétiques de régénération de l'émail.

L'article est téléchargeable selon la référence suivante :

J Dent Res. 2011 Sep;90(9):1091-7. doi: 10.1177/0022034511411301. Epub 2011 Jun 7.

IV. Rôle de la phosphorylation dans l'interaction du calcium avec LRAP

1. Contexte et question posée

Les différentes formes d'amélogénine sont synthétisées sous forme phosphorylée *in vivo*, avec un unique groupement phosphate au niveau de la Sérine en position 16 (Fincham and Moradian-Oldak, 1993). Les travaux de Wiedemann-Bidlack (Wiedemann-Bidlack et al., 2011) ont montré que l'état de phosphorylation a un effet mineur sur la formation de nanochaînes pour la forme complète d'amélogénine (P173 et rP172). Dans nos précédents travaux, nous avons montré que les formes phosphorylées ou non de LRAP présentaient également la capacité de former des nanochaînes et que ce potentiel était accru en présence de calcium tout particulièrement pour la forme phosphorylée (Le Norcy et al., 2011b). Les travaux de Le (Le et al., 2006) ont montré que la forme déphosphorylée de LRAP présente une capacité de liaison au calcium six fois supérieure à celle de la protéine complète (rH174).

L'objectif de cette partie du travail a donc été d'évaluer plus précisément le rôle de la phosphorylation de LRAP dans ses propriétés d'auto-assemblage en présence et en l'absence de calcium, avec une analyse par diffusion des rayons X aux petits angles (SAXS).

2. Matériel et méthodes

a. Préparation des solutions de protéines et de minéraux

Les différentes formes de LRAP utilisées dans cette étude ont été synthétisées puis purifiées comme décrit précédemment. Les protéines lyophilisées ont été pesées puis dissoutes dans de l'eau DDW afin d'obtenir une concentration de protéines de 7.5mg/mL et 5mg/mL. Ces solutions ont été conservées pendant 24h à 4°C afin de permettre une dissolution complète de la protéine, ce qui a ensuite été confirmé par Dynamic Light Scattering (DLS). Ces solutions ont ensuite été diluées à nouveau pour préparer des échantillons ayant une concentration finale de protéine de 5mg/mL et 2mg/mL.

P173:	MPLPPHPGHPGYINF^{S^P}YEVLTPWKYQNMIRHP-#-SLLPDLPLEAWPATDKTKREEVD
	<i>Domaine hydrophile</i>
LRAP(+P):	MPLPPHPGHPGYINF^{S^P}YEVLTPWKYQNMIRHPSLLPDLPLEAWPATDKTKREEVD
LRAP(-P):	MPLPPHPGHPGYINF^{S^P}YEVLTPWKYQNMIRHPSLLPDLPLEAWPATDKTKREEVD
#: Domaine hydrophobe central de 117 acides aminés	

Figure 34 : Différentes formes d'amélogénine utilisées

Des solutions de calcium (30mM) ont été préparées en utilisant les agents réactifs CaCl₂ (Sigma, >99,0% pureté) puis filtrées (0,22 µm) avant leur utilisation.

b. Diffusion des rayons X aux petits angles (SAXS)

i. Principe

La diffusion des rayons X aux petits angles permet d'étudier les propriétés structurales des matériaux à une échelle allant de 1 à 100 nm. Cette technique se base sur l'interaction élastique des photons avec les nuages électroniques. Les photons sont diffusés en traversant l'échantillon et fournissent des informations sur la fluctuation des densités électroniques dans la matière hétérogène. Le rayonnement monochromatique incident de vecteur d'onde k_i traverse l'échantillon. L'intensité diffusée est collectée en fonction de l'angle de diffusion θ . Les interactions élastiques sont caractérisées par un transfert d'énergie nul, le module du vecteur d'onde diffusé k_f est donc égal au module du vecteur d'onde incident. L'intensité diffusée est fonction du vecteur de diffusion : $S = |k_i - k_f| = 2\pi/d = (4\pi \cdot \sin\theta) / \lambda$

où θ est l'angle de diffusion et λ la longueur d'onde du faisceau incident.

L'intensité diffusée $I(s)$ est mesurée à des angles très petits ce qui permet d'étudier des structures de taille allant de distances cristallographiques (quelques Å) aux distances colloïdales (0,1µm). L'intensité d'une solution de particules est donnée par :

$$I(s) = \Delta\rho^2 \cdot \Phi_v \cdot V_p \cdot P(q) \cdot S(q)$$

où $\Delta\rho^2$ est le contraste, Φ_v est la fraction volumique, V_p est le volume d'une particule sèche, $P(q)$ est le facteur de forme de la particule et ne dépend que de sa géométrie et enfin $S(q)$ est le facteur de structure et décrit les corrélations entre particules.

ii. Préparation des échantillons

Le pH d'aliquotes de peptides a été ajusté à pH ~ 7,4 avec de petites quantités de KOH et de HCl concentrés pour obtenir des concentrations finales de LRAP de 2 mg/ml (0,31 mM) et 5

mg/ml (0,76 mM) avec un volume total de 70 μ l. Pour certaines expériences spécifiques, du chlorure de calcium a été ajouté aux solutions de peptides avant l'ajustement du pH afin d'obtenir des concentrations finales de 0,76mM à 2,5mM de calcium (volume total: 70 μ l). Par conséquent, sur une base molaire, le taux de calcium sur protéines variait de 1,0 à 8,1. Toutes les préparations d'échantillons ont été effectuées à température ambiante.

Les expériences de diffusion des rayons X aux petits angles ont été effectuées à la source nationale de rayonnement par Synchrotron du Brookhaven National Laboratory (Brookhaven, Connecticut, USA). La longueur d'onde des rayons X était 0,918 Å et la distance échantillon-détecteur était de 3,4 m. Le porte-échantillon est un tube capillaire en quartz de diamètre 0,9 mm ouvert à ses deux extrémités pour permettre l'écoulement continu de l'échantillon et éviter d'endommager les rayons X. Chaque mesure a nécessité 15 μ l d'échantillon et la durée d'exposition était de 30s à 13°C. Les mesures ont été effectuées en triple pour chaque expérience. Les données d'images bidimensionnelles ont été acquises sur un détecteur PILATUS 300K (DECTRIS, Suisse) puis la diffusion de l'eau a été soustraite à l'aide du logiciel pyXS (développé sur le site du synchrotron au BNL). Les données de SAXS ont ensuite été analysées en utilisant le logiciel Primus. Les équations de Guinier et de Kratky ont été utilisées pour analyser les données. L'analyse de Guinier est composée du tracé de ($\log I$ vs s^2) à un angle de diffusion S très bas ; elle a été utilisée pour déterminer le rayon de giration R_g et l'intensité extrapolée à l'angle de diffusion nul I_0 .

L'analyse de Kratky a été effectuée en traçant $I(s).s^2$ vs s et fourni des informations sur la conformation (degré de pliage) du peptide.

Le nombre de molécules par particule a été estimé à l'aide de la formule suivante:

$$N = (V_s \cdot N_A \cdot \delta_p) / F_w$$
 avec $V_s = (4\pi R_g^3)/3$, la densité de la protéine $\delta_p = 1,44 \text{ g/cm}^3$, N_A est la constante d'Avogadro et $F_w = 6537,52 \text{ Da}$.

3. Résultats et discussion

Le peptide LRAP, comme l'amélogénine, est une protéine phosphorylée qui est sécrétée avec un seul groupement phosphate sur la serine-16. Différentes études ont montré que ce groupement phosphate unique a une influence majeure sur les propriétés de l'amélogénine. Quelles soient complètes (P173) ou tronquées (P148, LRAP(+P), LRAP(+P,-CT)) les formes phosphorylées présentent toutes la capacité de stabiliser efficacement le phosphate de calcium amorphe (ACP), dans des conditions expérimentales destinées à induire la formation

spontanée de phosphates de calcium *in vitro*. À l'opposé de ces résultats, des formes non phosphorylées d'amélogénine ont la capacité de guider la formation de faisceaux ordonnés de cristaux d'hydroxyapatite (Beniash et al., 2005; Kwak et al., 2009; Le Norcy et al., 2011b). Nous avons montré précédemment à l'aide d'analyses par DLS et MET que la présence de calcium avait un effet inducteur sur la formation de structures en forme de chaîne pour la forme phosphorylée de LRAP. Nos résultats de SAXS appuient cette conclusion et montrent en outre que la présence de calcium a un effet profond sur la taille et la conformation du LRAP phosphorylé alors qu'elle a peu d'effet sur les caractéristiques de LRAP(-P).

La différence de conformation remarquable entre les formes phosphorylées et non phosphorylées de LRAP offre une explication possible pour les différences observées dans le l'assemblage des peptides et les effets que ces derniers ont sur la précipitation des phosphate de calcium *in vitro*. Les modifications de conformation de LRAP (+P), induites par l'addition de calcium, peuvent résulter d'interactions favorables du calcium avec des sites peptidiques spécifiques qui seraient exposés dans la forme initiale de LRAP(+P) moins pliée que le LRAP(-P) qui est déjà globulaire. De plus, les différences observées dans le pliage des deux formes du peptide et la tendance de LRAP(+P) à former des structures moins repliées en l'absence et la présence de calcium, peut aussi expliquer pourquoi la forme phosphorylée est beaucoup plus efficace dans la stabilisation des nanoparticules d'ACP et dans la prévention de la transformation ACP en HAP. La structure naturellement plus ouverte de LRAP(+P) et le pliage induit par le calcium pourraient conduire à une séquestration plus efficace des nanoparticules d'ACP en formation, qui empêcherait leur transformation en HAP. Le fait que LRAP(+P) ait été montré comme pouvant transitoirement stabiliser l'ACP (Le Norcy et al., 2011b) est cohérent avec les résultats actuels et notre hypothèse sur l'effet de la phosphorylation sur la conformation des protéines et de la minéralisation ; cette capacité étant dépendante pour LRAP et les formes complètes de l'amélogénine de la présence de l'extrémité C-terminale (Beniash et al., 2005; Kwak et al., 2009; Margolis et al., 2006). Il est donc possible que l'ACP initialement formé dans le développement de l'émail soit stabilisé par les amélogénines natives phosphorylées qui guident l'accumulation et l'arrangement linéaire de nanoparticules amorphes ; ces derniers servant ensuite de précurseurs pour la formation des cristaux émail.

L'article est téléchargeable selon la référence suivante :

Eur J Oral Sci. 2011 Dec;119 Suppl 1:97-102. doi: 10.1111/j.1600-0722.2011.00900.x.

V. Rôle de LRAP dans la formation et la minéralisation de l'émail

1. Contexte et question posée

L'amélogénine a un effet de rétrocontrôle en entraînant une augmentation de l'expression de son gène (Xu et al., 2006, 2008). Similairement, LRAP entraînerait également une accélération de la différenciation des cellules de l'organe de l'émail et une augmentation de l'expression d'amélogénine par ces cellules via le récepteur membranaire LAMP-1 et la voie de signalisation NO (Oxyde Nitrique) (Iacob and Veis, 2008; Le et al., 2007). De plus, LRAP semble également entraîner une augmentation de l'épaisseur d'émail synthétisé par les améloblastes pré-sécréteurs (E16) (Ravindranath et al., 2007). Nos études *in vitro* ont pour leur part montré un effet régulateur des LRAP sur la formation des cristaux d'HAP, avec LRAP(+P) qui stabilise transitoirement le phosphate de calcium amorphe (ACP) et LRAP(-P) qui exerce un effet morphogénique sur la croissance des cristaux. L'ensemble de ces données suggère que LRAP pourrait être un candidat potentiel pour le développement de stratégies thérapeutiques visant à réparer ou régénérer des défauts de structure de l'émail. Le but de ce travail a donc été d'évaluer les effets biologiques des formes phosphorylées et non phosphorylées de LRAP sur la différenciation des améloblastes et la formation de l'émail. À cette fin, nous avons exploité deux modèles expérimentaux: 1) la différenciation des lignées de cellules de type améloblastique LS8 et ALC cultivées dans des conditions de minéralisation et 2) des cultures *ex vivo* de germes de premières molaires de souris extraites à un jour postnatal (PD1) dans des milieux classiques et minéralisant.

2. Matériel et méthodes

a. Préparation des peptides de LRAP

Différentes formes du peptide LRAP (MPLPPHPGHPGYINF^SYEVLTPLKWKYQNMIRHPSLLDLPLEAWPATDKTKREEVD) comprenant le groupement phosphate au niveau de la Sérine en position 16, LRAP(+P) ou non LRAP(-P), ont été synthétisés commercialement (NEO Peptide, Cambridge, MA, USA) et repurifiées comme décrit précédemment (Nagano et al., 2009). Les protéines lyophilisées ont été pesées puis dissoutes dans de l'eau DDW à température ambiante afin d'obtenir une concentration de protéines de 2mg/mL. La concentration en protéine a été confirmée par une analyse au nanodrop.

b. Expériences de culture cellulaire

i. Cellules LS8

Les cellules LS8 sont des cellules de type améloblaste issues de lignée immortalisée. Ces cellules ont été générées à partir de cultures de cellules épithéliales de l'organe de l'émail de premières molaires de souriceaux nouveau-nés de type Swiss-Webster (Chen et al., 1992).

Elles nous ont été fournies par le Dr S. Babajko (Institut de Recherche des Cordeliers, Université Paris Diderot, Paris) avec l'accord du Pr Malcolm Snead (Ostrow School of Dentistry, University of Southern California, Los Angeles, CA, USA).

Après décongélation, les cellules LS8 sont cultivées dans du milieu DMEM contenant 1% Pénicilline – Streptomycine (PS) et 10% de Sérum de Veau Fœtal (SVF), puis après 48h passées à dans le même milieu mais avec 5% SVF. Les expériences de minéralisation sont réalisées en milieu DMEM contenant 1% PS, 5% SVF, 50µg/mL acide ascorbique et 5mM β-glycérophosphate. Les cellules sont passées en milieu de minéralisation lorsqu'elles atteignent 80-90% de confluence. Les milieux sont renouvelés tous les 2-3 jours après 2 rinçages au PBS.

ii. Cellules NIH3T3

Les cellules de type fibroblaste NIH3T3 ont été fournies par le Dr Laurent Mueller (Collège de France, Paris). Elles sont cultivées dans du milieu DMEM High Glucose contenant 1% PS et 10% de SVF. Leurs conditions de minéralisation sont identiques à celles utilisées pour les cellules LS8 à l'exception du DMEM remplacé par le DMEM high glucose.

iii. Cellules ALC

Les cellules ALC sont des cellules issues de la culture de germe de molaire mandibulaire de souriceaux C57BL de 6 jours (Nakata et al., 2003). Elles nous ont été fournies par le Dr Laurent Beck (Inserm U791 – LIOAD - Nantes) avec l'accord du Pr Nakata (Department of Biochemistry, Akita University School of Medicine, Akita, Japon).

Elles sont cultivées en milieu DMEM contenant 1% PS, 5% SVF et 10ng/mL du facteur de croissance épithélial de souris (mEGF) sur des boîtes dont les puits sont recouverts de collagène de type I. La minéralisation est induite dans du DMEM contenant 1% PS, 5% SVF, 10ng/mL mEGF, 10⁻⁸M Dexaméthasone, 50µg/mL acide ascorbique et 5mM β-glycérophosphate. Les milieux sont renouvelés comme pour les cellules LS8 et NIH3T3.

iv. *Analyse de la différenciation cellulaire*

1. Polymerase Chain Reaction quantitative (qPCR)

a. Sélection des amorces

Les séquences des amorces ont été déterminées et validées à l'aide du logiciel Blast (Altschul et al., 1990). Les amorces ont été validées sur des cDNA synthétisés à partir d'ARN de germes de molaire de souris E17. Les amorces utilisées pour l'amélogénine (R : CTGAAGGGTGTGACTCGGG et F : GATGGCTGCACCACCAAATC) permettent la synthèse d'un produit d'amplification de 65 paires de bases.

Les gènes pour GAPDH et Actine ont été analysés avec les amorces (GAPDH F : TGTGTCCGTCGTGGATCTGA, GAPDH R : TTGCTGTTGAAGTCGCAGGAG. Actine F : GTGGCATCCATGAACTACAT, Actine R : GGCATAGAGGTCTTTACGG) qui vont générer des fragments d'amplification de respectivement 150 et 71 paires de bases.

b. Préparation des échantillons pour la PCR quantitative

L'ARN total a été extrait des cellules LS8 à J0, J2 et J7 et des cellules ALC à J0, J2, J7, J9 et J14 à l'aide d'un kit Qiagen RNeasy Mini Kit. 500ng d'ARN totaux ont ensuite été retro-transcrits en ADN complémentaire à l'aide du kit Verso cDNA Synthesis Kit (Thermo Fisher Scientific). Les amorces précédemment citées ont été utilisées pour réaliser la PCR quantitative PCRq). Les échantillons de PCRq ont été préparés à l'aide du kit SYBR® Green Supermix (Bio-Rad) selon les recommandations du fabricant. Le niveau d'expression des gènes a ensuite été analysée à l'aide du logiciel LightCycler® 480 software (Roche, Applied Science). Tous les échantillons ont été analysés en triplicat et normalisés par rapport aux gènes d'actine et/ou de GAPDH.

2. Immunofluorescence

Les cellules ont été cultivées selon le même protocole de minéralisation que décrit précédemment sur des lames d'immunofluorescence LAbTek. Les lames ont été incubées 1 heure à température ambiante avec l'anticorps primaire de souris anti-amélogénine, lavées avec du tampon PBS puis mises en présence de l'anticorps secondaire pendant 1 heure, lavées au PBS puis colorées au DAPI (concentration) pendant 10 minutes.

v. *Coloration au Rouge Alizarine*

Les cellules cultivées dans les conditions de minéralisation ont subi une coloration au rouge alizarine à des temps de minéralisation définis.

Les cellules ont subi deux rinçages au PBS +/- puis une incubation de 2 minutes à température ambiante avec le rouge alizarine puis 3 rinçages à l'eau distillée dé-ionisée filtrée. La solution de rouge alizarine a été filtrée (0,22 µm) avant chaque utilisation.

vi. *Analyses du minéral en MET*

Des aliquotes de 10µL ont été prélevés depuis des zones de cultures cellulaires colorées au rouge alizarine observe en microscopie optique. Ces aliquotes ont ensuite été déposés sur des grilles de cuivre recouvertes de carbone (Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA, USA) et l'excédent a été absorbé par contact latéral de la grille contre du papier buvard. Les grilles ont été préparées en duplicata, les expériences ont été répétées trois fois. Les images ont été obtenues en mode champ clair et en mode de diffraction électronique (Selected Area Electron Diffraction: SAED) avec un microscope électronique à transmission Tecnai 12BT (MET) à 80kV.

c. *Expériences de culture de germes*

i. *Conditions de culture*

Les germes de premières molaires maxillaires et mandibulaires (n=125) de souriceaux Swiss-Webster de 1 jour (PD1) ont été extraits. Une partie des germes a été fixée par immersion dans du paraformaldéhyde (PFA) le jour de l'intervention et marqués « J0 ». Les germes restants ont été cultivés selon deux conditions :

- un milieu standard composé de DMEM F12 + 0.5% PS + 20% SVF + 0.18mg/mL acide ascorbique + 1x Glutamine
- un milieu minéralisant : αMEM + 1% PS + 10% SVF + 0.18mg/mL acide ascorbique + 5mM β-glycérophosphate + 1x Glutamine

Chaque puits (plaque 24 puits) contenait un mélange de 500µL de milieu +/- 26µg/mL LRAP(+P) ou LRAP(-P) + 250µL d'Agar. Lors de chaque expérience, 5 germes maxillaires et/ou mandibulaires par puit ont été cultivés séparément pendant 9 jours ; les milieux ont été renouvelés tous les deux jours. Les expériences ont été répétées quatre fois.

ii. *Extraction des ARN et PCR quantitative*

L'ARN total a été extrait des germes de première molaire maxillaire à J0 et J9 à l'aide d'un kit Qiagen RNeasy Micro Kit. 50ng d'ARN totaux ont ensuite été retro-transcrits en ADN complémentaire à l'aide du kit Verso cDNA Synthesis Kit (Thermo Fisher Scientific). Les amorces précédemment citées ont été utilisées pour réaliser la PCR quantitative (PCRq). Les échantillons de PCRq ont été préparés à l'aide du kit SYBR® Green Supermix (Bio-Rad) selon les recommandations du fabricant. La quantité d'expression des gènes a ensuite été analysée à l'aide du logiciel LightCycler® 480 software (Roche, Applied Science). Tous les échantillons ont été analysés en triplicat et normalisés aux gènes d'actine et/ou de GAPDH.

iii. *Analyse par microCT*

Après 9 jours de culture, les germes ont été fixés dans le PFA 4% durant 30 minutes, rincés au PBS et conservés dans l'éthanol 70%. La minéralisation des germes a été mesurée à l'aide d'un scanner microCT à rayons X (Quantum FX Caliper, Life Sciences, Perkin Elmer, Waltham, MA, USA) à 90kV et 160µA. Les images tridimensionnelles ont été obtenues pour une dimension de voxel isotropique de 20µm et une marche de rotation de 0,1° (durée du scan= 3 minutes). Chaque scan a été calibré avec un calibre d'HAP contenant des solutions saturées de citrate de plomb à 100%, 50% et 25%. Avant chaque acquisition par microCT, le calibre a été scanné avec un fantôme d'HAP et une valeur d'hydroxyapatite a ainsi été attribuée aux niveaux de gris correspondant à chaque concentration de citrate de plomb. Cette calibration a permis la comparaison des valeurs de gris (densité moyenne) obtenues entre les différents scans expérimentaux. Les données reconstruites ont ensuite été converties en images 8-bit et les seuils maximaux et minimaux de luminosités ont été fixés de façon similaire entre les différents scans à l'aide du logiciel « CT analyzer » (Skyscan, release 1.15.4.0, Kontich, Belgium). Un procédé de segmentation binaire a été appliqué uniformément sur chaque stock de données afin de séparer le tissu minéralisé du tissu non minéralisé au sein de chaque germe analysé. La valeur seuil utilisée pour la binarisation a été fixée manuellement et les mêmes valeurs de gris attribuées d'une part à la densité globale du germe et d'autre part à la densité du minéral ont été utilisées pour tous les scans expérimentaux. Le pourcentage de minéral a été obtenu en divisant le volume de minéral par le volume total du germe obtenus à l'aide du logiciel.

iv. Analyse par FE-SEM

Les germes fixés au PFA cultivés dans le milieu minéralisant ont été observés au microscope électronique à balayage (MEB) à émission de champ (FE-SEM) (Zeiss SUPRA 40).

Les germes de molaires ont été séchés à l'air libre puis places sur les supports de MEB sans préparation préalable. Les images ont été obtenues à l'aide du détecteur d'électrons secondaires (SE2) pour les trois premiers niveaux de grossissement (177 to 226x, 10kx, 20kx) et en utilisant le détecteur In-Lens pour le grossissement le plus élevé (40kx).

d. Analyse statistique

Les analyses statistiques ont été réalisées en utilisant le test t de Student à l'aide du logiciel Excel (Microsoft) pour des échantillons indépendants non appariés. Le seuil de significativité a été fixé au minimum à $p < 5\%$.

3. Résultats

a. Effets des peptides de LRAP sur la différenciation des améloblastes

i. Analyse par PCR quantitative

Afin d'étudier l'effet des peptides phosphorylés versus non-phosphorylés sur la différenciation des améloblastes, l'expression du gène de l'amélogénine, la principale protéine de la matrice l'émail, a été évaluée dans deux modèles de cultures de cellules validés : les cellules de type LS8, dont le phénotype correspond à des améloblastes de type sécréteur et les cellules ALC dont le phénotype correspond à celui d'améloblastes plus matures (Sarkar et al., 2014).

Pour les cellules LS8, 2 jours de culture dans le milieu minéralisant en présence des deux formes de peptides a entraîné une augmentation statistiquement significative de la transcription du gène de l'amélogénine, avec un effet toutefois plus marqué pour la forme non phosphorylée LRAP(-P) (Figure 35A). Cette augmentation de l'expression est temporaire, car à 7 jours de culture dans les mêmes conditions, les deux formes de LRAP présentent un effet inhibiteur sur la transcription d'amélogénine comparativement au contrôle (Figure 35A).

Les cellules ALC ont présenté un comportement différent. Alors qu'aucune modification dans la transcription d'amélogénine n'est enregistrée après deux jours de culture dans le milieu minéralisant ; une augmentation significative du nombre de transcrits est observée après 7 jours de culture pour les deux formes du peptide comparativement au contrôle, à nouveau de façon plus marquée pour le LRAP(-P). Après 14 jours de culture en milieu minéralisant, la transcription du gène de l'amélogénine a diminué en présence des deux formes du peptide pour atteindre le niveau du contrôle (Figure 35B).

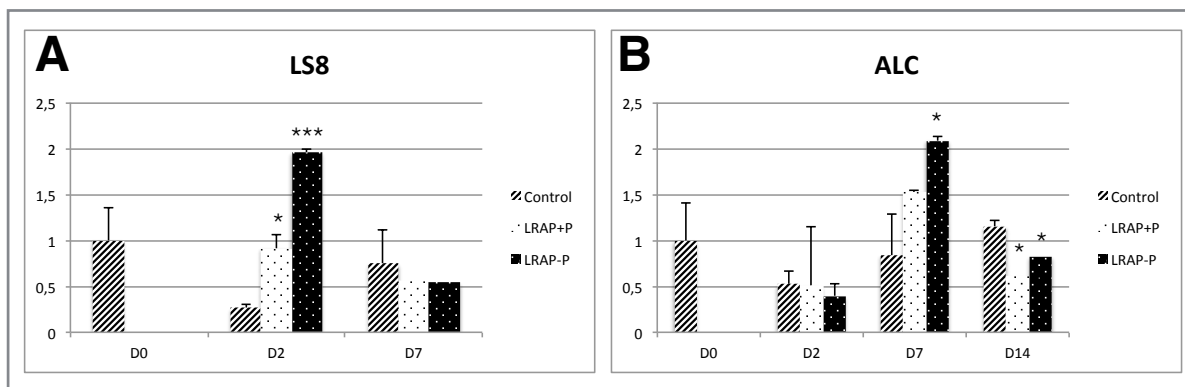


Figure 35 : Cinétique d'expression du gène de l'amélogénine dans les cellules LS8 et ALC. A et B: Résultats des analyses de PCR quantitative pour LS8 (A) et ALC (B). L'expression de l'amélogénine a été normalisée pour la GAPDH et l'Actine. Les niveaux d'expression moyenne et d'écart type ont été calculés à partir de 3 différentes expériences de qPCR (chaque série, en trois exemplaires, $n = 3$). A J2, les deux peptides ont induit une augmentation statistiquement significative de transcrits d'amélogénine par rapport au témoin pour les LS8 ($p < 0,05$ pour LRAP (+ P) et $p < 10^{-4}$ pour LRAP (-P)). A J7, les deux peptides ont induit une augmentation similaire pour les ALC, statistiquement significative pour LRAP (-P) ($p < 0,05$) par rapport au témoin.

ii. Analyse par immunofluorescence

L'expression d'amélogénine a été étudiée pour les cellules LS8 cultivées pendant 4 jours en milieu minéralisant en l'absence (contrôle) et en présence de 100ng/mL de LRAP(-P).

Comme pour les transcrits correspondants, on observe (Figure 36) à J4 une augmentation de l'expression d'amélogénine en présence de LRAP(-P) par rapport au contrôle à J4 et aux cellules à J0.

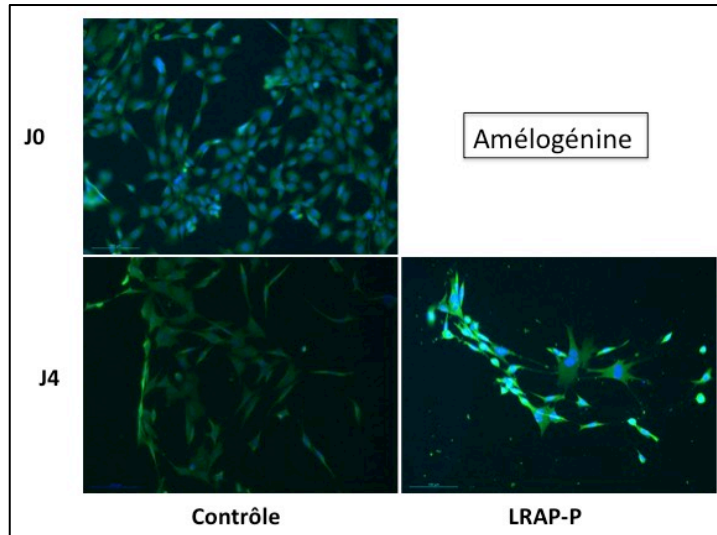


Figure 36 : Analyse par immunofluorescence de l'expression d'amélogénine par des cellules LS8 cultivées en l'absence (contrôle) et en présence de 100ng/mL LRAP(-P).

b. Effets des peptides LRAP sur la minéralisation des améloblastes

i. Validation du modèle de minéralisation

Avant d'évaluer l'effet des peptides LRAP sur la formation de cristaux nous avons vérifié la capacité de nos modèles cellulaires à minéraliser de façon spécifique, en particulier pour les cellules LS8 qui ont été peu utilisées dans un contexte de minéralisation. Dans ce but, les cellules LS8, ALC et les fibroblastes de la lignée NIH3T3, utilisés ici comme contrôle négatif, ont été cultivées en parallèle, en milieu de minéralisation. Après 7 jours de culture, seules les cellules LS8 montrent la présence de nombreux nodules de minéralisation qui sont colorés spécifiquement par le rouge alizarine (figure 37 – A-C). Dans les cellules ALC, la présence de petits nodules de minéralisation anguleux colorés par le rouge alizarine (Figure 38) devient évidente après deux semaines de traitement, stade où la culture de LS8 commencent à dégénérer. Les cellules NIH3T3 ne forment par contre aucun nodule et ne présentent aucune coloration (figure 37 - B, D). Ces observations montrent la spécificité du processus de minéralisation des cellules LS8 et ALC dans les conditions de culture utilisées.

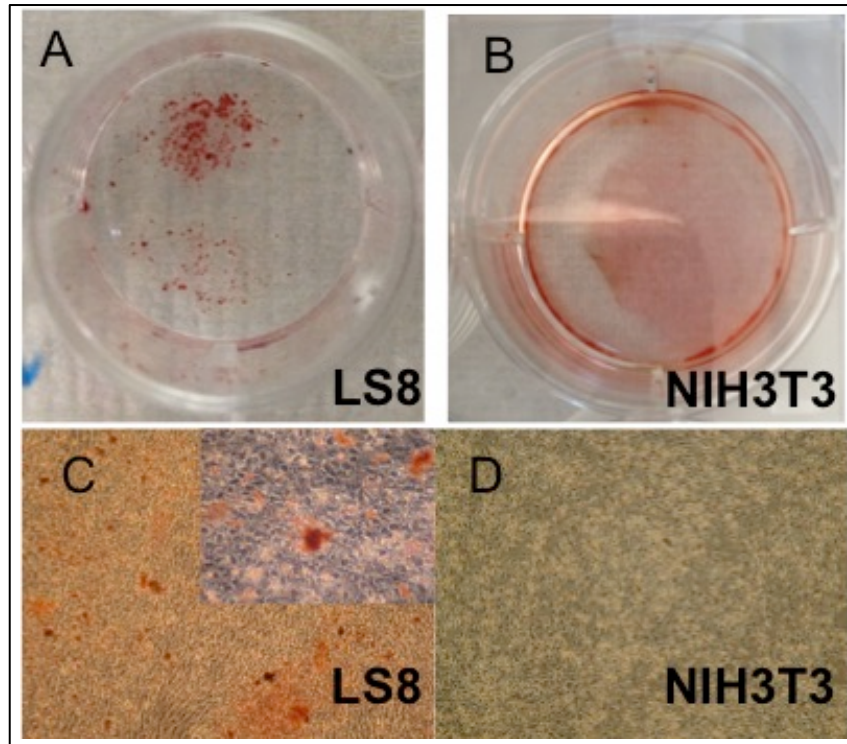


Figure 37 : Coloration par rouge alizarine des cultures de cellules LS8 et NIH3T3 après 7 jours en milieu de minéralisation

ii. Analyse du minéral formé par les cellules LS8 et ALC

Les effets des deux formes de LRAP sur la minéralisation et la formation des cristaux par les améloblastes ont été étudiés par Microscopie Electronique à Transmission (MET) et diffraction électronique (SAED).

Le traitement des cellules LS8 par LRAP(-P) semblait entrainer une légère augmentation de la coloration par rouge alizarine à 7 jours et le traitement par LRAP(+P) ne semblait pas entrainer de différence dans l'intensité de la coloration de ces cellules par rapport au contrôle.

Pour les cellules ALC, aucune différence de coloration n'était objectivable à 14 jours entre les cultures traitées par les deux formes de peptide et le contrôle (Figure 38).

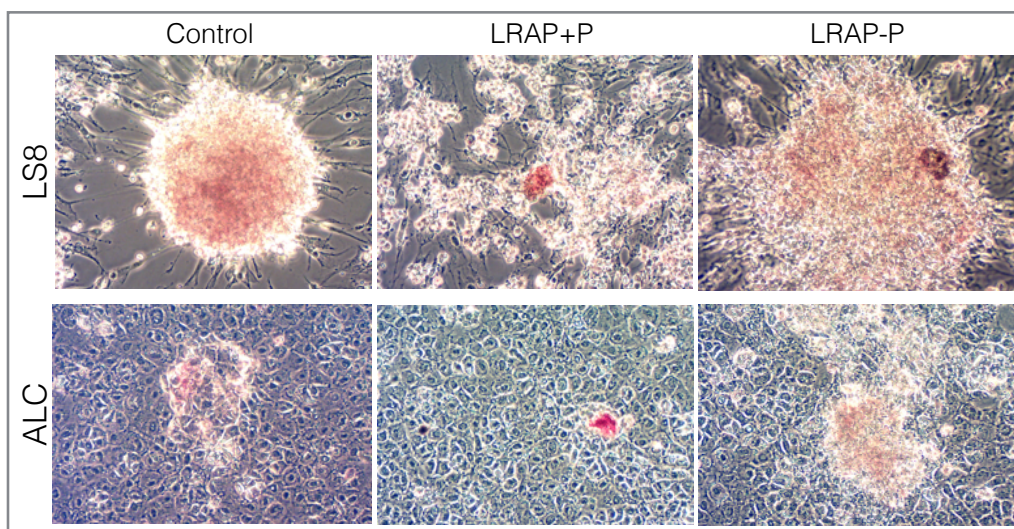


Figure 38 : Coloration au rouge alizarine des cellules LS8 après 7 jours de culture en milieu minéralisant et des cellules ALC après 14 jours de culture en milieu minéralisant en présence de LRAP(+P), de LRAP(-P) et en l'absence de peptide (contrôle).

Des analyses par MET et SAED ont donc été réalisées sur des échantillons prélevés à 7 jours pour les cellules LS8 et 14 jours pour les cellules ALC (Figure 39 et Figure 40).

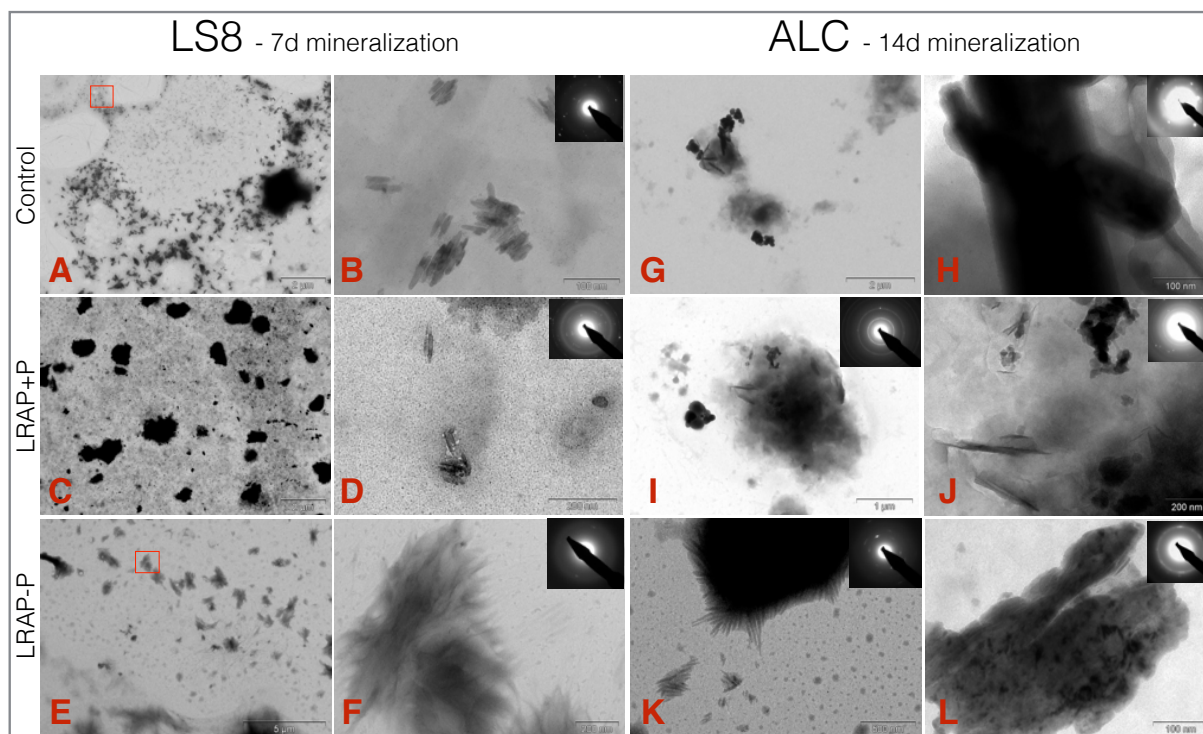


Figure 39 : Analyses par MET et SAED des phases minérales formées dans les conditions de minéralisation par les cellules LS8 (A à F) à J7 et ALC (G à L) à J14 en l'absence (contrôle) et la présence de peptides. (A, B, G et H) contrôle, absence de peptides; (C, D, I et J) LRAP(+P)

et (E, F, K et L) LRAP(-P). Des cristaux allongés ordonnés d'HAP (basé sur les images de SAED) ont été formés dans le contrôle (A, B) et en présence de LRAP(+P) (C, D) dans les cellules de LS8. En présence de LRAP(-P), les cristaux d'HAP semblaient plus fins, plus longs et regroupés en paquets (E, F). De très gros cristaux ronds et allongés d'HAP sont présents dans le contrôle (G, H) pour les cellules ALC. Lors de l'addition de LRAP(+P) (I, J) et de LRAP(-P) (K, L), des cristaux ordonnés, organisés et allongés d'HAP aiguilles ont été formés.

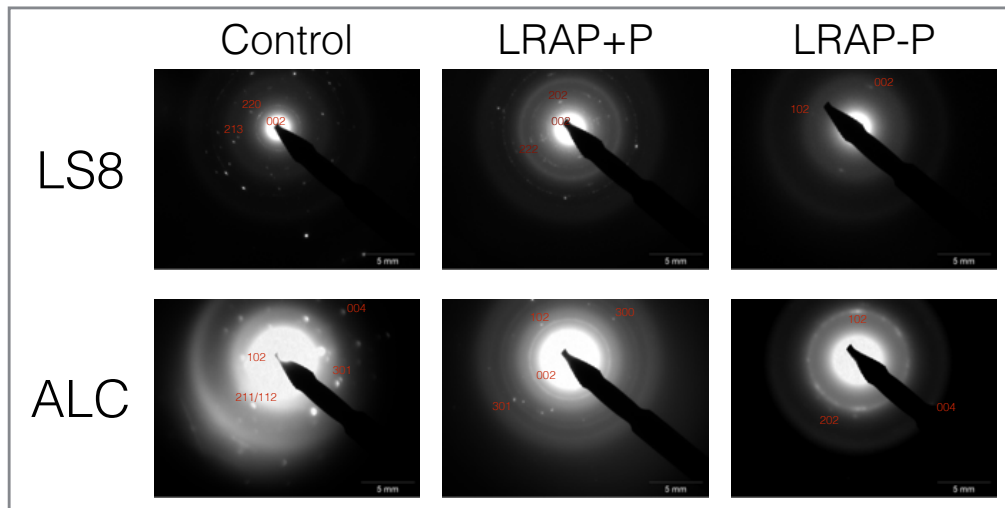


Figure 40 : Anneaux de diffusion électroniques du minéral formé par les cellules LS8 et ALC en l'absence (contrôle) et en présence de LRAP(+P) et de LRAP(-P). On note la présence de points de diffraction sur des anneaux caractéristiques de l'hydroxyapatite.

L'analyse du minéral formé par les cellules LS8 a révélé des cristaux d'HAP, de forme allongée, dispersés pour le contrôle mesurant une longueur moyenne de 43.9 ± 7.8 nm ($n=24$) (Figure 39 A et B). En présence de LRAP(+P), des cristaux d'HAP allongés, dispersés mais légèrement plus longs (longueur moyenne 56.7 ± 9.2 nm ($n=35$)) ont été observés (Figure 39 C et D) ; alors que l'addition de LRAP(-P) a entraîné la formation de fagots de cristaux d'HAP fins et très allongés (longueur moyenne 103 ± 17.8 nm ($n=34$)) (Figure 39 E et F). Les deux formes de LRAP ont donc entraîné un allongement des cristaux d'HAP par rapport au contrôle avec une augmentation de 100% pour le LRAP(-P) et de 29,7% pour le LRAP(+P) (Figure 41 A). La forme déphosphorylée LRAP(-P) semble donc favoriser particulièrement l'allongement et le regroupement des cristaux d'HAP.

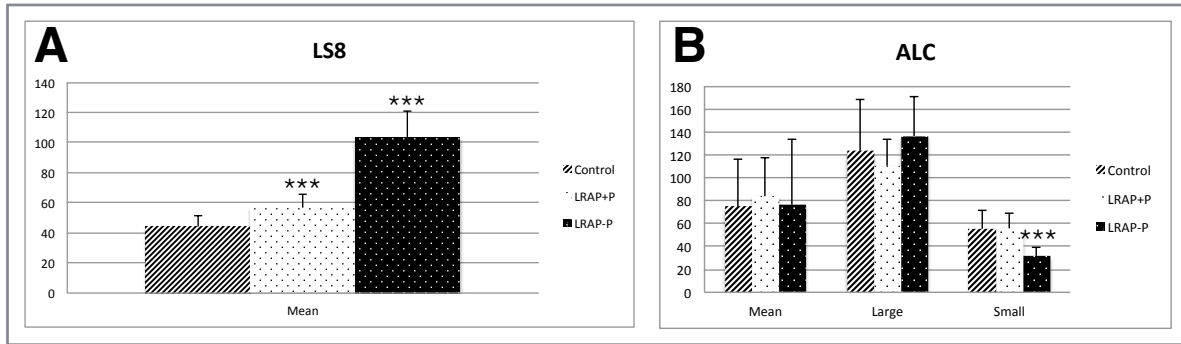


Figure 41: Mesure de la longueur des cristaux d'HAP synthétisés en l'absence (contrôle) et en présence de LRAP(+P) et de LRAP(-P) par les cellules LS8 (A) et ALC (B). La longueur moyenne des cristaux d'HAP a été mesurée sur les images de MET à J7 pour les LS8 et J14 pour les ALC dans le contrôle, et les cellules traitées par LRAP(+P) et LRAP(-P). Une augmentation statistiquement significative de la longueur des cristaux a été observée dans les deux conditions de traitement dans les cellules de LS8 ($p < 6.10^{-10}$, $n = 34$). Pour les cellules ALC, en raison de la grande hétérogénéité des cristaux observés, les analyses statistiques ne sont pas pertinentes. Une légère augmentation de la longueur a été observée avec le traitement par LRAP(-P) pour les cristaux plus longs et une légère baisse a été observée pour les cristaux les plus courts.

L'analyse du minéral formé par les cellules ALC après 14 jours de culture en milieu minéralisant a révélé un mélange de très larges cristaux arrondis et de quelques gros cristaux allongés d'HAP mesurant en moyenne 342.7 ± 49.5 nm de longueur pour le contrôle; une très faible quantité de cristaux allongés de petite taille (74.9 ± 40.9 nm ($n=16$)) était également présente (Figure 39 G et H). Après 14 jours de culture en présence de LRAP(+P), on observe des cristaux d'HAP à un stade très précoce de nucléation (Figure 40 et 42 A et B), en cours de transformation en cristaux allongés (alignement des points sur les arcs 002 et 004) et des cristaux plus matures allongés bien organisés (rangs parallèles) d'HAP (Figure 42C) mesurant en moyenne 84 ± 33.1 nm ($n=34$) (Figure 39 I et J).

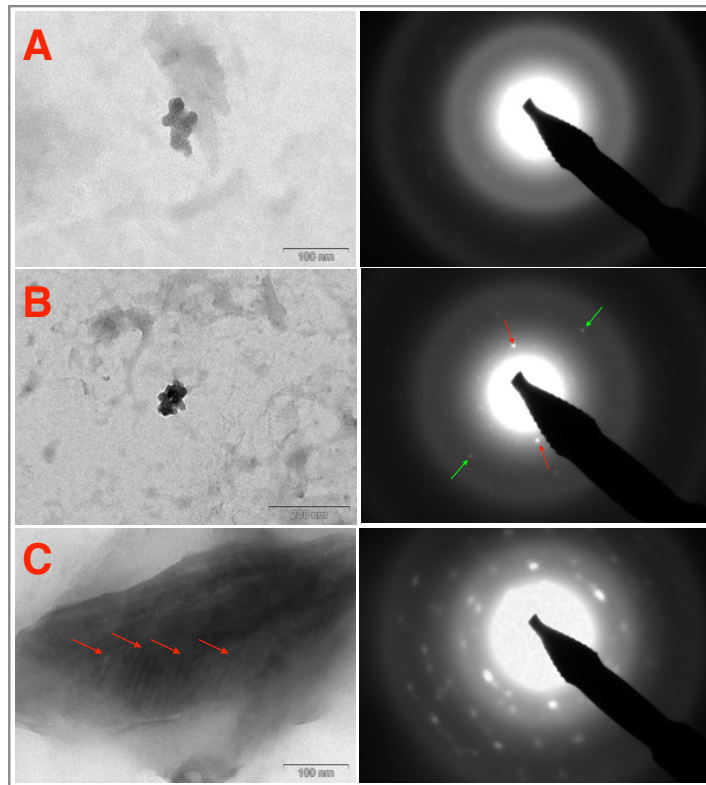


Figure 42 : Images par MET et diffractions électroniques (SAED) correspondantes pour les différentes phases minérales formées par les cellules ALC en présence du peptide LRAP(+P). On observe en A et B des cristaux d'HAP à un stade très précoce de nucléation, en cours de transformation en cristaux allongés (alignement des points sur les arcs 002 et 004). En C, on observe l'organisation en rangs parallèles (flèches) des cristaux allongés d'HAP formés

Le traitement des cellules en culture par LRAP(-P) a entraîné la formation de fagots de cristaux allongés organisés (rangs parallèles) mesurant une longueur moyenne de 76.2 ± 57.1 nm ($n=42$) (Figure 39 K et L).

Dans toutes les conditions de culture, les cristaux étaient composés d'un mélange de longs (123.5 ± 45.2 nm pour le contrôle, 110.4 ± 22.7 pour LRAP(+P) et 135.6 ± 35.3 nm pour LRAP(-P)) et de courts (55.5 ± 16.4 nm pour le contrôle, 55.9 ± 12.8 nm pour LRAP(+P) et 31.7 ± 8.1 nm pour LRAP(-P)) cristaux d'HAP. L'organisation du minéral formé était cependant très différente en l'absence et en présence du peptide. Tandis que les larges cristaux étaient prédominants dans le contrôle, ils étaient absents dans les cellules cultivées avec les peptides. De plus, dans ces conditions (culture en présence de LRAP), les cristaux allongés étaient bien organisés en rangs parallèles alors que dans le contrôle ils étaient éparpillés aléatoirement.

c. Effets des peptides LRAP sur la croissance et la différenciation du germe de molaire en culture

Afin de mieux comprendre les effets de LRAP sur la formation du minéral, dans un contexte plus physiologique, nous avons cultivé des germes de molaires immatures isolés à PD1 sur un milieu semi-solide (Bègue-Kirn et al., 1992; Tompkins et al., 2005) en l'absence (contrôle) et en présence des deux formes de peptide. Deux conditions de culture ont été évaluées : un milieu standard (S) et un milieu minéralisant (M).

i. *Validation du modèle de culture (histologie)*

1. Milieu Standard

Les coupes histologiques des germes dentaires non déminéralisés colorés au Trichrome de Masson nous permettent d'observer dans le milieu standard, une progression harmonieuse de la croissance et du développement du germe dentaire. On note une augmentation de l'épaisseur de la couche de dentine (D - colorée en bleu) entre 2 et 5 jours de culture ainsi qu'une augmentation de l'épaisseur de la couche d'améloblastes (A) (Figure 43). Il a été impossible d'obtenir des coupes des germes après 9 jours de culture, ni après inclusion en paraffine, ou en résine méthyl-méthacrylate, ce qui suggère fortement que la croissance et la minéralisation s'est poursuivie.

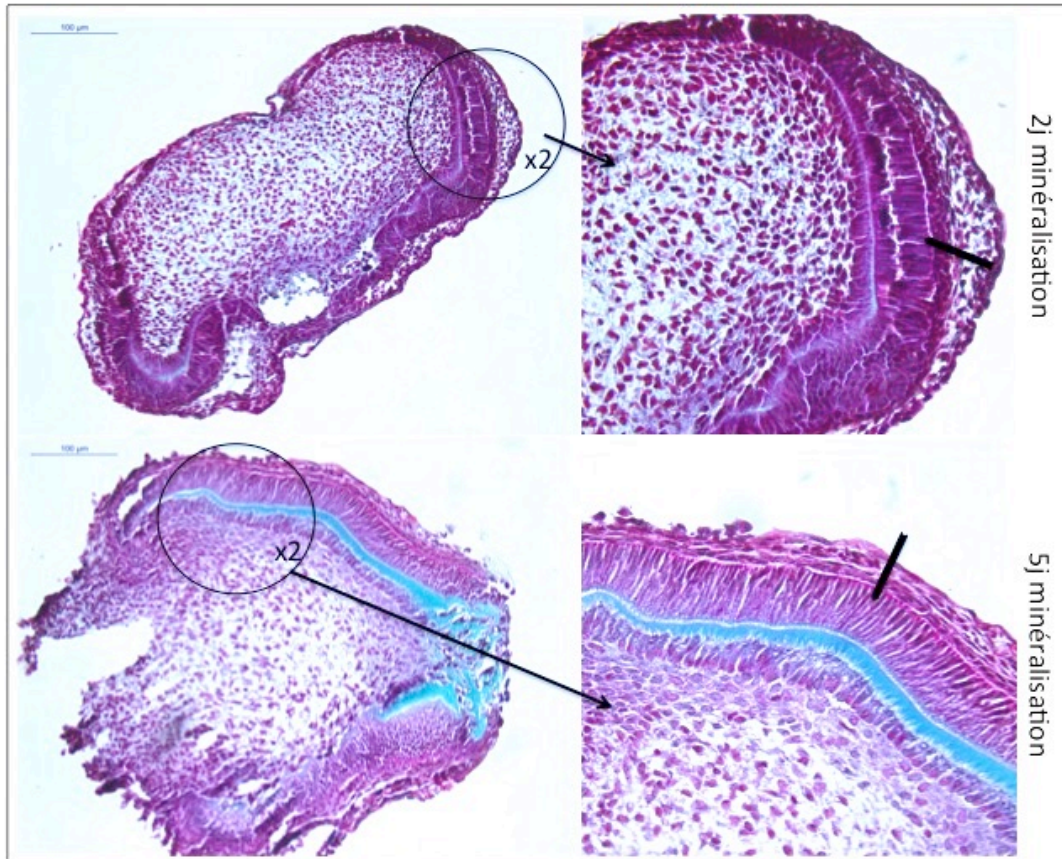


Figure 43 : Coupes histologiques non déminéralisées de germes de première molaire de souris cultivées pendant 2 jours (ligne supérieure) et 5 jours (ligne inférieure) dans le milieu standard. Coloration par Trichrome de Masson. On note un épaississement de la zone de dentine (bleue) synthétisée à 5j ainsi qu'un léger allongement des améloblastes (flèche pleine) attestant de la croissance du germe entre 2 et 5 jours de culture.

2. Milieu minéralisant

Les germes non déminéralisés mis en culture dans le milieu minéralisant présentent des difficultés de coupe histologique dès J2. En effet, l'échantillon est déjà minéralisé et les structures sont déchirées lors de la coupe histologique pour des inclusions en paraffine. Une inclusion en résine méthyl-méthacrylate a été réalisée mais compte tenu de la très petite taille du germe, les coupes se sont également déchirées. Ces difficultés techniques suggèrent néanmoins que, dans le milieu minéralisant, les germes minéralisent plus rapidement qu'en milieu S.

ii. Analyse par PCR quantitative

Des analyses de PCR quantitative (qPCR) ont été réalisées à J0 et J9 pour déterminer l'évolution de la transcription d'amélogénine entre les germes cultivés en l'absence

(contrôle) et en présence de LRAP(+P) et de LRAP(-P). Après 9 jours de culture dans le milieu standard, on observe une augmentation de la transcription d'amélogénine dans toutes les conditions (Figure 44S) de façon cohérente avec la croissance progressive du germe (Figures 43 et 45). A l'inverse, la transcription d'amélogénine a été fortement réduite dans le milieu M comparativement aux germes prélevés à J0 (Figure 44M). Ce résultat est cohérent avec nos observations d'histologie attestant d'une minéralisation plus rapide du germe.

Dans les deux milieux, LRAP(+P) a provoqué une augmentation de la transcription d'amélogénine par rapport au contrôle à J9 alors que LRAP(-P) a eu un effet légèrement activateur dans le milieu M et inhibiteur dans le milieu S (Figure 44).

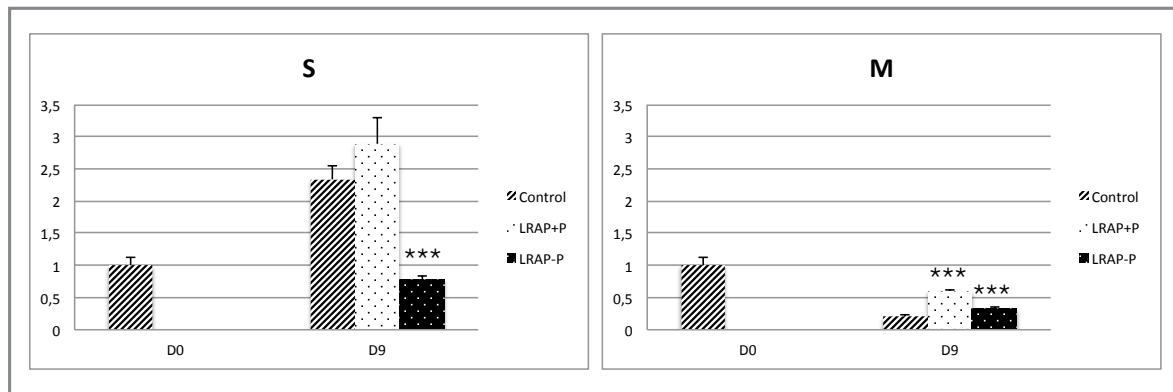


Figure 44 : Expression du gène de l'amélogénine par les germes de premières molaires en culture. Les niveaux des transcrits d'ARNm ont été comparées entre J0 (germes PD1) et J9 pour les deux milieux de culture. Une augmentation de l'expression amélogénine a été observée dans le contrôle et avec LRAP(+P) pour les germes cultivés dans le milieu standard. LRAP (-P) semble inhiber l'expression d'amélogénine par rapport au contrôle. Les niveaux de transcrits d'ARNm pour l'amélogénine sont diminués dans toutes les conditions dans le milieu M par rapport au germe J0. Cependant, le traitement par LRAP(+P) et LRAP(-P) induit une augmentation de l'expression d'amélogénine par rapport au contrôle.

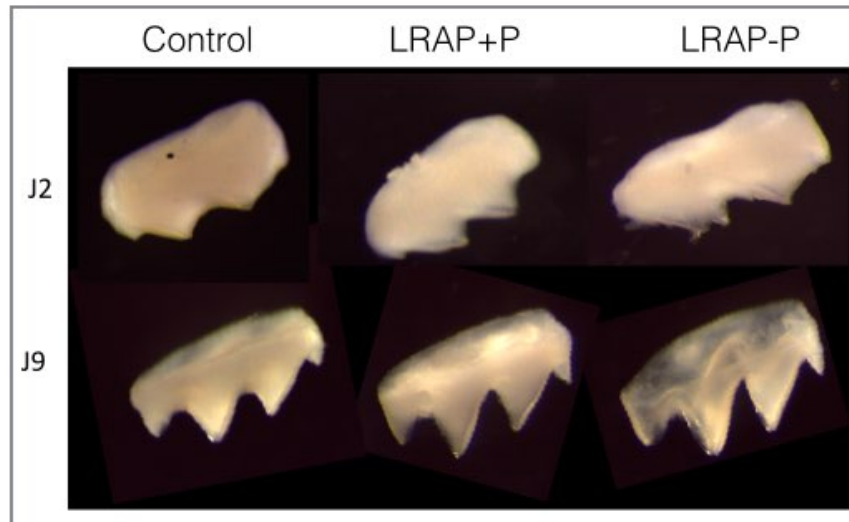


Figure 45 : Vues macroscopiques des germes à 2 jours et 9 jours de culture en milieu S en l'absence (contrôle) et en présence de LRAP(+P) et LRAP(-P)

d. Effets des peptides LRAP sur la minéralisation du germe

i. Analyse par microCT

La minéralisation des germes a été évaluée à l'aide d'analyse par microCT. La « densité » représente une moyenne des niveaux de gris présents dans l'ensemble du germe, alors que le « pourcentage de minéral » ne correspond qu'au tissu le plus dense (émail) (Figure 46).

Dans la culture en milieu standard, aucune différence de densité n'a pu être observée entre les échantillons alors qu'une forte augmentation de densité est observée pour les germes cultivés en milieu minéralisant à J9 (Figure 46 A et C). L'évaluation du pourcentage de minéral a par contre révélé une augmentation dans les deux milieux à J9 par rapport à J0 (Figure 46 B et D), bien que plus marquée dans le milieu minéralisant. De plus les germes cultivés en présence de LRAP(+P), on entraîné une augmentation du pourcentage de minéral dans les deux milieux mais également de façon plus marquée dans le milieu minéralisant par rapport au contrôle à J9. En revanche, LRAP(-P) ne semble pas avoir eu d'effet sur le pourcentage de minéral par rapport au contrôle quel que soit le milieu de culture (Figure 46 B et D). Ces résultats suggèrent donc que le LRAP(+P), contrairement au LRAP(-P) a un effet stimulateur sur la minéralisation des germes de molaires immatures (PD1).

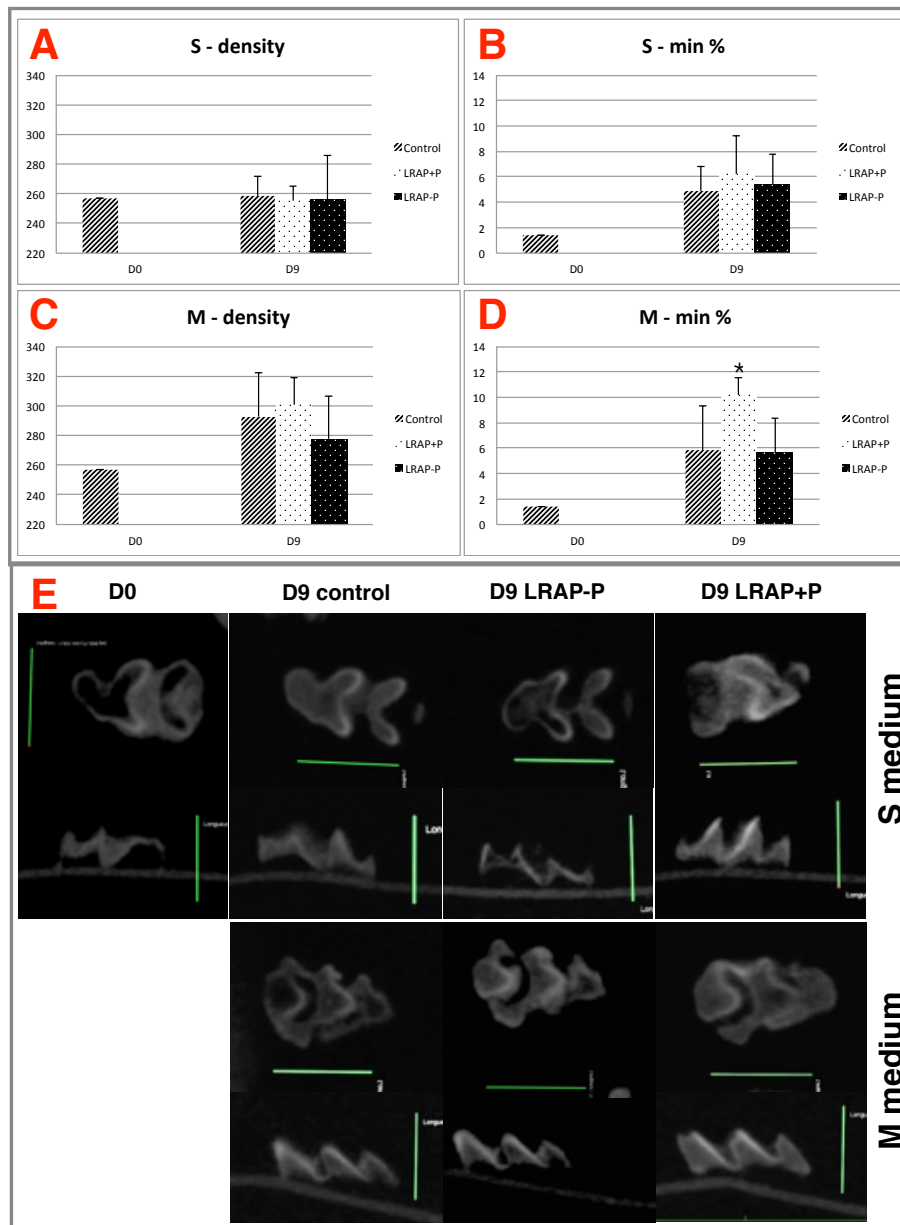


Figure 46 : Densité et pourcentage de minéral des germes PD1 cultivés dans les milieux S et M et images représentatives sélectionnées de microCT. La densité minérale moyenne (A, C) et le pourcentage de minéral (B, D) ont été calculés à partir de scans de microCT de germes de molaires à J0 et après 9 jours de culture dans le milieu S (A, B) et dans le milieu M (C, D). Une augmentation du pourcentage de minéral a été observée dans tous les échantillons dans le milieu S à J9 par rapport à J0 (B), mais aucune différence n'a été observée pour la densité minérale moyenne (A). Dans le milieu M, l'addition de LRAP(+P) a conduit à une augmentation statistiquement significative ($p < 0,05$) du pourcentage de minéral par rapport au contrôle à J9 (D), aucune différence n'a pu être observée entre les échantillons traités par LRAP(-P) et les contrôles. Dans les deux milieux, tous les échantillons présentaient une augmentation du pourcentage de minéral à J9 par rapport à J0 (D); en outre, une augmentation de la densité minérale moyenne a également été observée dans tous les échantillons à J9 par rapport à J0 dans le milieu M (C). (E), Coupes axiales et transversale représentatives de microCT des différents temps et conditions de culture illustrent ces conclusions.

ii. *Analyse par FE-SEM*

Au cours de l'amélogenèse, l'email interprismatique est la première couche d'email synthétisée par l'améloblaste, formant des puits d'email qui seront ensuite remplis d'email prismatique au fur et à mesure du retrait des prolongements de Tomes et de la dégradation du contenu protéique de la matrice (Bidlack et al., 2014).

Les germes cultivés en milieu minéralisant ayant présenté le plus de différence de minéralisation dans le temps (augmentation de la densité et du pourcentage de minéralisation entre J0 et J9), nous avons décidé d'observer le minéral formé sur ces échantillons au FE-SEM. Comme *in vivo*, des puits amélaire et une organisation des cristaux ont été clairement observés dans les trois échantillons analysés (contrôle, LRAP(+P) et LRAP(-P)) à J9 (Figure 47). Les puits d'email sont apparus plus petits et plus espacés dans les germes cultivés en présence de LRAP(+P) que dans le contrôle et identiques à légèrement plus larges que le contrôle pour les germes traités par LRAP(-P) (Figure 47). De plus, au plus fort grossissement (40kx), l'email des germes cultivés en présence de LRAP(+P) apparaît plus dense que celui du contrôle et celui des germes cultivés en présence de LRAP(-P) mieux organisé (longs cristaux parallèles) mais moins dense. Ces résultats suggèrent une accélération du processus de minéralisation (maturation des améloblastes) par le LRAP(+P), et une légère inhibition de la formation des cristaux d'email par LRAP(-P).

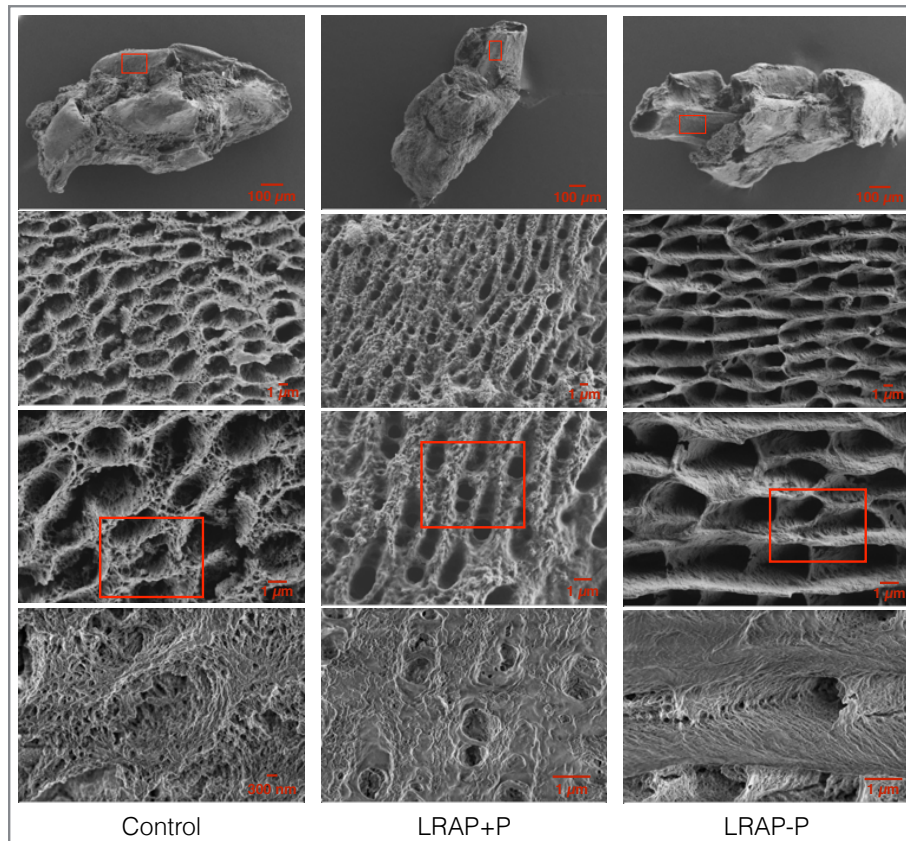


Figure 47 : Analyses par FE-SEM des germes de premières molaires cultivés dans le milieu M. Les puits d'améloblastes et l'organisation des cristaux sont clairement observés pour les trois échantillons cultivés dans le milieu M. Les puits amélaire sont apparus plus petits et plus espacés dans les cultures de germes traités par LRAP(+P) par rapport au contrôle et similaires à légèrement plus larges pour les germes traités par LRAP(-P). En outre, au plus fort grossissement à 40kx (ligne du bas), l'émail est apparu plus dense avec LRAP(+P) par rapport au contrôle et plus organisé (longs cristaux parallèles) avec LRAP(-P) par rapport au contrôle.

iii. Difficultés rencontrées

Outre les difficultés de coupes histologiques, les expériences de culture de germes dentaires ont été compliquées par la très grande hétérogénéité de développement des germes prélevés chez des animaux, même issus de la même portée, du même âge.

Ainsi, les germes prélevés à J0 présentaient déjà des différences de développement et donc de degrés de minéralisation. Les germes prélevés ont été répartis à l'aveugle entre les différentes conditions expérimentales. Ce problème explique les grands écarts-types résultant des analyses de la minéralisation par microCT.

4. Discussion et conclusion

Différentes études (Iacob and Veis, 2008; Le et al., 2007; Stahl et al., 2013; Tompkins et al., 2005; Ye et al., 2006) ont mis l'accent sur l'identification du rôle de LRAP dans la différenciation de l'améloblaste et de l'odontoblaste et beaucoup ont exploré comment la forme complète d'amélogénine et ses différents produits de clivage pouvaient guider la formation de cristaux d'hydroxyapatite de l'émail (Beniash et al., 2005; Kwak et al., 2009; Margolis et al., 2006; Moradian-Oldak et al., 1998; Tarasevich et al., 2007; Wang et al., 2007). Cependant, très peu d'expériences (Stahl et al., 2013) ont essayé de comprendre le rôle de LRAP dans ce processus, alors que le peptide est synthétisé tout au long de l'amélogénèse et contient les deux domaines actifs de la forme complète (Paine and Snead, 1997; Pugach et al., 2010; Yuan et al., 1996).

Afin d'obtenir une réponse à cette question, nous avons évalué l'effet biologique des peptides LRAP sur deux modèles de lignées bien caractérisées immortalisées d'améloblaste : les cellules de lignée LS8 (Chen et al., 1992) et les cellules de la lignée ALC (Nakata et al., 2003) ainsi que sur des germes de molaires de souris PD1 cultivés *ex vivo*. La première lignée de cellules correspond à des améloblastes à un stade sécréteur tandis que la seconde correspond à des améloblastes plus matures (Sarkar et al., 2014).

Jusqu'à présent, les lignées cellulaires de LS8 et ALC ont été principalement exploitées pour la compréhension du contrôle des mécanismes cellulaires biologiques des améloblastes, mais la structure du minéral formé n'a jamais été caractérisée. Il a cependant été montré que les deux lignées peuvent former des nodules de minéralisation (Nakata et al., 2003; Sarkar et al., 2014). En accord avec ces observations, nous avons montré la capacité de ces deux lignées cellulaires à initier un processus de minéralisation lorsqu'elles sont cultivées dans un milieu minéralisant, et ce, plus rapidement pour les cellules LS8 que ALC (après 7 jours contre 14 jours respectivement). Dans ce contexte et de façon complémentaire à des observations antérieures (Iacob and Veis, 2008; Le et al., 2007), nous avons montré que les deux isoformes de LRAP sont capables d'augmenter l'expression d'amélogénine dans les deux lignées cellulaires (LS8 et ALC) par rapport aux cellules contrôles non traitées, cependant avec une cinétique de réponse différente. La lignée cellulaire LS8 a répondu très rapidement au traitement par LRAP (après 48h) alors que la lignée cellulaire ALC a répondu de façon différée (après 7 jours). Cette observation conforte une étude récente montrant que la lignée cellulaire LS8 correspond à des améloblastes sécréteurs déjà activement impliqués dans la

synthèse de l'amélogénine alors que les cellules ALC correspondent à des améloblastes matures plus impliqués dans la croissance et la maturation des cristaux. De façon surprenante, l'état de phosphorylation du peptide ne semble pas être un facteur prépondérant puisque les deux formes induisent une augmentation de la transcription de l'amélogénine par les deux lignées cellulaires.

Nos précédents résultats *in vitro* (Le Norcy et al., 2011a, 2011b), ont montré que le LRAP phosphorylé a la capacité de stabiliser de manière transitoire le phosphate de calcium amorphe de manière similaire à l'amélogénine complète (Beniash et al., 2009; Moradian-Oldak, 2012a) et que le traitement par LRAP(-P) conduit à la formation de faisceaux de cristaux allongés. Des résultats similaires ont été obtenus avec la lignée cellulaire ALC. Dans les cellules ALC non traitées, les cristaux synthétisés étaient pour la plupart de très grande taille et dispersés de manière aléatoire. Alors que suite au traitement par LRAP, nous avons pu observer un changement frappant dans la forme et l'organisation du minéral: les cristaux d'HAP se sont allongés et organisés en réseaux parallèles comme on le voit dans la dent *in vivo*. En outre, des phases plus précoces ont pu être observées en présence de LRAP(+P).

Les cristaux synthétisés par les cellules LS8 non traitées sont apparus très similaires à ceux pouvant être observés dans l'émail des dents *in vivo*. Le traitement des cellules par LRAP(+P) a entraîné une légère augmentation de la longueur de cristal mais a eu peu d'effet sur la forme générale et l'organisation des cristaux ; alors que LRAP(-P) a semblé favoriser l'allongement cristaux et la formation de fagots comme cela a été observé dans les souris AMELX KO- Tg LRAP (Gibson et al., 2009). Ces données obtenues sur des modèles cellulaires suggèrent donc que les peptides LRAP affectent non seulement l'expression d'amélogénine comme cela avait été montré précédemment mais également l'organisation du minéral, de façon similaire à l'*in vitro* (Le Norcy et al., 2011a, 2011b). De plus, leur action semble dépendre de l'état de phosphorylation du peptide ainsi que du stade de la différenciation de l'améloblaste.

L'effet de LRAP sur la formation minérale dans un contexte plus physiologique a été évalué par la culture de germes de molaires immatures au stade d'améloblastes sécréteurs (PD1). Le milieu standard a initialement été choisi pour étudier l'effet du peptide sur la différenciation des améloblastes et le milieu minéralisant pour étudier la formation de cristaux. De façon intéressante, dans les deux milieux, LRAP(+P) a induit une augmentation de l'expression d'amélogénine semblable à ce que nous avons observé avec les cellules LS8, tandis que le LRAP(-P) a exercé un effet inhibiteur sur cette transcription. De façon inattendue, dans le milieu S, les niveaux de transcrits d'AMELX ont été beaucoup plus élevés que dans le milieu

M ; ce résultat est cohérent avec la croissance des germes observée par analyse histochimique. Ces résultats indiquent que le milieu S soutient la différenciation des améloblastes et la croissance progressive des molaires au moins jusqu'à un certain point; tandis que le milieu M entraîne une minéralisation rapide de l'émail. En contraste avec LRAP(-P), ces effets ont été améliorés par le peptide LRAP(+P).

Des vues macroscopiques des molaires à J2 et J9 de culture et l'analyse par micro-CT ont confirmé ces observations. Les analyses par micro-CT et par FE-SEM du minéral formé dans toutes les conditions ont en effet révélé une augmentation de la minéralisation en présence de LRAP(+P) mais pas en présence de LRAP(-P). Des études antérieures (Ravindranath et al., 2007; Tompkins et al., 2005) ont décrit une augmentation de l'épaisseur d'émail des germes traités avec LRAP(-P), mais ces expériences avaient été menées sur des germes de molaires prélevés à des stades plus précoces (E16 et E17).

Enfin, l'inhibition drastique observée de la synthèse d'amélogénine dans le milieu M et les données minérales soutiennent l'hypothèse que ces conditions de culture sont favorables à une minéralisation rapide de la matrice déjà synthétisée par l'améloblaste sécréteur à PD1 et qui limite la poursuite de la croissance et de la différenciation du germe.

Au total, nos résultats indiquent donc que LRAP(+P) induit une augmentation significative de l'expression d'amélogénine qui peut alors conduire à une augmentation de la formation de cristaux et de la teneur en minéraux. LRAP(+P) semble stabiliser des phases plus précoces de minéral et permet également la synthèse de faisceaux parallèles d'HAP dans l'améloblaste mature. Ce résultat est cohérent avec le fait que LRAP est synthétisée sous la forme phosphorylée *in vivo* (Fincham and Moradian-Oldak, 1993). LRAP(-P) entraîne en revanche, la synthèse par les améloblastes sécréteurs de longs et fins cristaux d'HAP bien organisés, comme nous l'avons vu pour les cultures de cellules LS8 et de germe *ex vivo*.

Ces résultats pourraient ouvrir la voie pour le développement de traitements de certains défauts de la formation de l'émail tels que l'amélogénèse imparfaite, en augmentant la transcription d'amélogénine et en participant à la croissance et à l'organisation des cristaux.

Conclusion et Perspectives

A travers ce travail de recherche, nous avons tout d'abord cherché à comprendre si le petit peptide LRAP, composé exclusivement des extrémités N- et C- terminales actives de l'amélogénine complète, présentait les mêmes capacités d'auto-assemblage en nanochaînes que son homologue de pleine longueur et si cette capacité lui conférait également des propriétés morphogéniques sur les cristaux d'hydroxyapatite en formation.

Pour ce faire, nous avons d'une part, étudié les propriétés d'assemblage de différentes formes du peptide (avec ou sans l'extrémité C-terminale, avec ou sans phosphate) *in vitro* dans des conditions expérimentales physiologiques ; et d'autre part, observé l'effet de ces différentes formes sur le minéral en formation dans des expériences de précipitation spontanée de phosphate de calcium *in vitro*.

Nous avons ainsi montré que les deux formes du peptide avaient la capacité de former des nanosphères, s'assemblant ensuite en nanochaînes et que cette capacité était accentuée par la présence d'ions calcium dans le milieu environnant, tout particulièrement pour le LRAP(+P). Nos résultats de SAXS nous ont permis de mieux comprendre l'effet du calcium sur la conformation du peptide. Nous avons en effet observé qu'alors que la forme déphosphorylée de LRAP se présentait sous forme de sphère à l'état monomérique et ne voyait sa structure que peu modifiée par l'adjonction de calcium ; le LRAP(+P) était lui présent sous une forme dépliée et ne se repliait pour former des sphères qu'en présence de concentrations croissantes de calcium. Nos résultats par DLS et MET ont également montré que l'extrémité C-terminale était indispensable à la formation de ces structures d'assemblage plus complexe (nanochaînes).

Le LRAP partage donc les mêmes propriétés d'auto-assemblage que la forme complète d'amélogénine ; et similairement, ces propriétés sont absentes pour leurs produits de clivage (LRAP-CT et P148 ou rP147).

Compte tenu de ce résultat et de l'hypothèse selon laquelle les nanochaînes d'amélogénine guident la formation de cristaux allongés d'hydroxyapatite, nous avons étudié l'effet des différentes formes de LRAP sur la morphogenèse des cristaux de phosphates de calcium.

Nous avons montré, que similairement aux formes complètes (P173) et clivées (P148) de l'amélogénine, LRAP(+P) et LRAP(+P,-CT) stabilisent transitoirement le phosphate de

calcium amorphe (ACP) *in vitro*. Par ailleurs, nous avons montré que LRAP(-P), comme rP172, permet la formation de faisceaux de cristaux allongés d'hydroxyapatite et que cette capacité n'est pas retrouvée pour les produits de clivage de l'amélogénine (rP147) et de LRAP (LRAP(-P, -CT)).

A travers ces résultats nous avons donc montré que le petit peptide LRAP présente les mêmes caractéristiques biologiques (capacités d'auto-assemblage en nanochaînes et propriétés morphogéniques sur les cristaux d'hydroxyapatite en formation) *in vitro* que la forme complète d'amélogénine.

Par ailleurs, il a également été montré que LRAP avait un rôle de molécule de signalisation et permettait une activation de la transcription d'amélogénine par l'améloblaste. Nous avons donc également voulu étudier l'effet de LRAP sur la différenciation de l'améloblaste et vérifier, dans des modèles biologiques, nos observations précédentes sur la minéralisation à l'aide de deux modèles de culture cellulaires (le premier correspondant au stade d'améloblaste sécréteur et le second au stade d'améloblaste mature) et un modèle de culture de germes de molaire *ex vivo* correspondant à l'améloblaste sécréteur.

Nous avons ainsi montré que similairement à nos observations précédentes *in vitro*, le traitement des cellules et des germes par LRAP(-P) entraînait la formation de cristaux fins, allongés et regroupés d'hydroxyapatite. Ce traitement permettait également une activation de la différenciation cellulaire mais un léger défaut de minéralisation des germes cultivés *ex vivo*. Le traitement des cellules de type mature (ALC) par le LRAP(+P) a permis d'observer la formation de phases plus précoces de minéral et l'effet morphogénique majeure de ce peptide sur l'organisation des cristaux d'HAP, organisation similaire à ce que l'on peut observer *in vivo*. Le traitement des germes cultivés *ex vivo* par ce peptide a également abouti à une accélération de leur maturation à travers une activation de la transcription d'amélogénine et une augmentation de la minéralisation du germe. Enfin LRAP(+P) entraînait, comme LRAP(-P) mais dans une moindre mesure, une accélération de la différenciation des améloblastes sécréteurs et matures.

L'émail dentaire peut être altéré à travers deux mécanismes principaux. Il peut subir d'une part des défauts lors de sa formation ou d'autre part une déminéralisation acide lors de phénomènes carieux ou de troubles alimentaires et digestifs de type régurgitations acide.

Différentes altérations structurelles de l'émail ont été rapportées à ce jour ; elles peuvent être locales ou généralisées. Les amélogénèses imparfaites peuvent avoir pour origine l'altération de nombreux gènes (Bei, 2009; Wright et al., 2015) (figure 48) mais les altérations de l'émail peuvent également être associées à de nombreuses autres maladies génétiques ou syndromes non dentaires comme la dysplasie ectodermique, l'épidermolyse bulleuse dystrophique ou certaines formes de maladie céliaques (Wright et al., 2015).

OMIM	Category of Condition and Inheritance	Gene/Locus	Enamel Phenotype
Autosomal dominant			
104500	Amelogenesis imperfecta, type IB ; AIIB	ENAM	Localized and generalized hypoplastic
104510	Amelogenesis imperfecta, type IV ; AI4	DLX3	TDO
104530	Amelogenesis imperfecta, hypoplastic type	nk	Hypoplastic-failure to erupt and calcification of pulp
130900	Amelogenesis imperfecta, type III ; AI3	FAM83H	Localized or generalized hypomineralized enamel
Autosomal recessive			
204650	Amelogenesis imperfecta, type IC ; AIIC	ENAM	Generalized hypoplastic
204700	Amelogenesis imperfecta, hypomaturation type IIA1 ; AI2A1	KLK4	Normal enamel thickness, hypomineralized orange brown color
612529	Amelogenesis imperfecta, hypomaturation type IIA2 ; AI2A2	MMP20	Normal enamel thickness, hypomineralized orange brown color
613211	Amelogenesis imperfecta hypomaturation type IIA3 ; AI2A3	WDR72	Hypomaturation creamier, opaque enamel upon eruption, discoloration and loss of tissue post eruption
614253	Amelogenesis imperfecta and gingival fibromatosis syndrome	FAM20A	Generalized hypoplastic and failure of tooth eruption, gingival hypertrophy
614832	Amelogenesis imperfecta hypomaturation type IIA4 ; AI2A4	C4ORF26	Hypomaturation AI
615887	Amelogenesis imperfect hypomaturation type IA5	SLC24A4	Hypomaturation AI
X-linked			
301200	Amelogenesis imperfecta IE type AIIE	AMELX	Hypoplasia, hypomaturation depending on mutation and protein effect
301201	Amelogenesis imperfecta, hypoplastic/hypomaturation, x-linked 2	Xq22-q28	Enamel hypoplasia and hypomaturation

Figure 48 : Phénotypes associés aux différents gènes impliqués dans l'amélogénèse imparfaite (Wright et al., 2015)

Par ailleurs, l'émail peut également être altéré lors de sa formation par des facteurs environnementaux comme dans le cas de fluoroses ou de syndrome d'hypominéralisation molaire et incisive (MIH).

Pour la fluorose, beaucoup de changements causés par le fluor sont liés à des troubles des interactions cellule / matrice / minéraux au cours de la formation des dents. Au stade de

maturation précoce, la quantité relative d'amélogénine dans l'émail présentant une fluorose est augmentée de manière dose-dépendante. Cela semble être le résultat d'un retard dans l'élimination de l'amélogénine au cours de la maturation de l'émail. *In vitro*, quand le fluor est incorporé dans le minéral, une quantité plus importante de protéine est associée au minéral en formation, et l'élimination des protéines par les protéinases est retardée. Ceci suggère que la modification des interactions protéine/ minéral soit en partie responsable de la rétention de l'amélogénine et de l'hypominéralisation qui se produit dans l'émail fluorotique (Tanimoto et al., 2008). Le fluor semble également augmenter la précipitation minérale au cours de la formation de dents, entraînant des bandes d'émail hyperminéralisées suivies ensuite par des bandes hypominéralisées. Une augmentation de la précipitation minérale associée à des augmentations locales de l'acidité de la matrice pourrait affecter les cycles de modulation de l'améloblaste mature. Ce phénomène a été constaté chez le rongeur, avec une altération dose dépendante, du passage entre améloblastes à bordure lisse et bordure plissée suite à des expositions au fluor (Denbesten and Li, 2011).

Le syndrome d'hypominéralisation molaire et incisive (MIH), défini comme l'hypominéralisation de l'émail des premières molaires et des incisives permanentes, a une prévalence variant entre 2,8% et 37,5% (Willmott et al., 2008). Différentes étiologies ont été décrites comme l'exposition aux perturbateurs endocriniens et en particulier le bisphénol A (Jedeon et al., 2014) ou l'occurrence de nombreux épisodes infectieux ou inflammatoires durant les premières années de vie (Allazzam et al., 2014). La microstructure de l'émail des dents permanentes hypominéralisées a été décrit comme ayant des gaines de prisme moins distinctes et un manque d'organisation des cristaux d'émail. Les propriétés mécaniques, la dureté et le module d'élasticité de l'émail hypominéralisé présentent ainsi des valeurs plus faibles que l'émail normal (Fagrell et al., 2010; Mahoney et al., 2004; Xie et al., 2008).

Nos derniers résultats relatifs aux effets de LRAP sur la minéralisation par les améloblastes en culture et sur la minéralisation des germes en culture pourraient s'inscrire dans la thérapeutique de ces atteintes génétiques ou systémiques de l'émail lors de sa formation. Il serait en effet envisageable de traiter les germes dentaires en croissance par l'administration locale de LRAP chez des patients diagnostiqués pour une forme frustre d'amélogénèse imparfaite ou pour un MIH. Ceci nécessiterait la poursuite de nos travaux de recherche, dans un premier temps par l'étude de l'effet de LRAP(+P) sur des cultures de germes dentaires d'animaux présentant une amélogénèse imparfaite ou d'animaux soumis à des perturbateurs endocriniens selon un protocole similaire à celui utilisé par Jedeon et coll. Puis dans un

second temps sur des cultures de germes dentaires de patients présentant une amélogénèse imparfaite comme des troisièmes molaires ou des germes de prémolaires extraites pour raisons orthodontiques. Bien que des expériences de secours du phénotype d'amélogénèse imparfaite par la surexpression de LRAP chez des souris amélogénine KO ait été réalisées à plusieurs reprises avec un résultat mitigé (Gibson et al., 2009; Stahl et al., 2015), il est possible que des additions de LRAP à des stades plus tardifs de l'amélogénèse (améloblaste sécréteur et mature) aient un effet plus important sur l'organisation des cristaux d'émail.

Les altérations de l'émail sont le plus souvent le résultat de la dissolution des cristaux d'hydroxyapatite d'un émail initialement sain. C'est le cas lors de lésions carieuses localisées ou d'acidification globale du milieu buccal (régurgitations, consommation excessive de boissons et/ou d'aliments acides). D'après l'organisation mondiale de la santé, à travers le monde en 2012, 60 à 90% des enfants d'âge scolaire et 100% des adultes présentaient une lésion carieuse. Aujourd'hui, seul un traitement par débridement tissulaire (suppression du tissu carié) et remplacement par une résine composite est réalisé. Différentes équipes (Czajka-Jakubowska et al., 2009; Fan et al., 2009, 2011; Jeong et al., 2011; Jiang and Liu, 2004; Kirkham et al., 2007; Shafiei et al., 2015; Yin et al., 2009) ont tenté des expériences biomimétiques de régénération de l'émail *in vitro*. La principale difficulté est que l'émail mature est un tissu acellulaire, les améloblastes ne peuvent donc pas être réactivés pour synthétiser à nouveau de l'émail sain, ces derniers ayant été dégradés à la fin de l'amélogénèse. Les pistes utilisées par ces équipes étaient donc l'utilisation de protéines, de peptides synthétiques, d'ions, ou la modulation des conditions environnementales (degré de supersaturation) afin de guider l'orientation des cristaux similairement à la séquence observée *in vivo* lors de la formation de l'émail (Ruan and Moradian-Oldak, 2015). Deux difficultés majeures sont apparues, la première est de guider la formation des cristaux dans le prolongement de ceux déjà présent au sein de la surface amélaire dégradée ; la seconde est d'assurer une interface cohésive entre les cristaux déjà présents et ceux nouvellement formés. Dans leur récente étude, Shafiei et coll. (Shafiei et al., 2015) ont étudié le rôle de LRAP(-P) sur la reminéralisation de l'émail d'incisives de bœuf, déminéralisé par traitement à l'acide phosphorique selon le protocole classique décrit par Ruan et Moradian-Oldak (Ruan and Moradian-Oldak, 2014). Les conditions expérimentales de concentration en ions et en peptide étaient celles décrites dans nos travaux (Le Norcy et al., 2011b). Leurs résultats montrent un allongement des cristaux selon leur axe *c* en présence de LRAP(-P) permettant une reconstruction de l'émail avec une structure prismatique.

Deux pistes thérapeutiques sont alors envisageables, la première est en continuité avec les travaux de Shafiei et coll. et consiste en l'application topique de solutions de LRAP(-P) sur des lésions carieuses expérimentales *in vivo*. Ceci nécessite l'incorporation du LRAP dans une matrice ; l'ACP a été présenté comme un nano-transporteur potentiel (Aizenberg et al., 2003; Cao et al., 2010), il pourrait alors servir de matrice et de substrat pour les cristaux d'émail en formation. L'autre piste est la culture d'améloblastes prélevés dans des germes dentaires, cultivés *in vitro* puis redéposés en fond de lésion. Ceci nécessite également une matrice qui permette la poursuite de la formation des cristaux et la survie des cellules implantées. Au cours de nos expériences, nous avons cultivé les cellules LS8 dans des matrices 3D de collagène avec des résultats de culture très satisfaisants ; l'utilisation d'une telle matrice dans des conditions similaires à celle décrites pour la culture et la minéralisation de cellules pulpaire (Coyac et al., 2013) pourrait donc être envisagée.

Nous avons donc montré à travers nos différents travaux de recherche que LRAP présentait des propriétés très proches de celles de la forme complète de l'amélogénine sur la morphogenèse des cristaux d'émail tant dans la temporalité (capacité de la forme phosphorylée de stabiliser transitoirement le phosphate de calcium amorphe) que dans l'espace (capacité des deux formes de LRAP de former des cristaux allongés et organisés d'hydroxyapatite) dans des modèles de précipitation *in vitro* et de cultures de cellules de type améloblaste. Nous avons également montré que l'exposition d'un germe dentaire au stade d'améloblaste sécréteur à la forme phosphorylée du LRAP permettait d'augmenter le degré de minéralisation de ce germe. Ces résultats expérimentaux nous offre donc différentes pistes thérapeutiques pour le traitement, à la fois des lésions de type carieuse et des atteintes de l'émail au cours de son développement rendues possibles par la facilité de synthèse du LRAP contrairement à la forme complète de l'amélogénine.

Bibliographie

- Aichmayer, B., Margolis, H.C., Sigel, R., Yamakoshi, Y., Simmer, J.P., and Fratzl, P. (2005). The onset of amelogenin nanosphere aggregation studied by small-angle X-ray scattering and dynamic light scattering. *J. Struct. Biol.* *151*, 239–249.
- Aichmayer, B., Wiedemann-Bidlack, F.B., Gilow, C., Simmer, J.P., Yamakoshi, Y., Emmerling, F., Margolis, H.C., and Fratzl, P. (2010). Amelogenin nanoparticles in suspension: deviations from spherical shape and pH-dependent aggregation. *Biomacromolecules* *11*, 369–376.
- Aizenberg, J., Muller, D.A., Graul, J.L., and Hamann, D.R. (2003). Direct fabrication of large micropatterned single crystals. *Science* *299*, 1205–1208.
- Allazzam, S.M., Alaki, S.M., and Meligy, O.A.S. El (2014). Molar incisor hypomineralization, prevalence, and etiology. *Int. J. Dent.* *2014*, 234508.
- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., and Lipman, D.J. (1990). Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* *215*, 403–410.
- Bartlett, J.D. (2013). Dental enamel development: proteinases and their enamel matrix substrates. *ISRN Dent.* *2013*, 684607.
- Bartlett, J.D., and Simmer, J.P. (2015). New perspectives on amelotin and amelogenesis. *J. Dent. Res.* *94*, 642–644.
- Bègue-Kirn, C., Smith, A.J., Ruch, J.V., Wozney, J.M., Purchio, A., Hartmann, D., and Lesot, H. (1992). Effects of dentin proteins, transforming growth factor beta 1 (TGF beta 1) and bone morphogenetic protein 2 (BMP2) on the differentiation of odontoblast in vitro. *Int. J. Dev. Biol.* *36*, 491–503.
- Bei, M. (2009). Molecular genetics of tooth development. *Curr. Opin. Genet. Dev.* *19*, 504–510.
- Beniash, E., Simmer, J.P., and Margolis, H.C. (2005). The effect of recombinant mouse amelogenins on the formation and organization of hydroxyapatite crystals in vitro. *J. Struct. Biol.* *149*, 182–190.
- Beniash, E., Metzler, R.A., Lam, R.S.K., and Gilbert, P.U.P.A. (2009). Transient amorphous calcium phosphate in forming enamel. *J. Struct. Biol.* *166*, 133–143.
- Bidlack, F.B., Huynh, C., Marshman, J., and Goetze, B. (2014). Helium ion microscopy of enamel crystallites and extracellular tooth enamel matrix. *Front. Physiol.* *5*, 395.
- Bloch-Zupan, A., Leveillard, T., Gorry, P., Fausser, J.L., and Ruch, J.V. (1998). Expression of p21(WAF1/CIP1) during mouse odontogenesis. *Eur. J. Oral Sci.* *106 Suppl 1*, 104–111.
- Boabaid, F., Gibson, C.W., Kuehl, M.A., Berry, J.E., Snead, M.L., Nociti, F.H., Katchburian, E., and Somerman, M.J. (2004). Leucine-rich amelogenin peptide: a candidate signaling molecule during cementogenesis. *J. Periodontol.* *75*, 1126–1136.
- Bonass, W.A., Kirkham, J., Brookes, S.J., Shore, R.C., and Robinson, C. (1994). Isolation and characterisation of an alternatively-spliced rat amelogenin cDNA: LRAP--a highly conserved, functional alternatively-spliced amelogenin? *Biochim. Biophys. Acta* *1219*, 690–692.

- Boyde, A. (1997). Microstructure of enamel. *Ciba Found. Symp.* 205, 18–27; discussion 27–31.
- Buchko, G.W., Tarasevich, B.J., Bekhazi, J., Snead, M.L., and Shaw, W.J. (2008). A solution NMR investigation into the early events of amelogenin nanosphere self-assembly initiated with sodium chloride or calcium chloride. *Biochemistry (Mosc.)* 47, 13215–13222.
- Cao, S.-W., Zhu, Y.-J., Wu, J., Wang, K.-W., and Tang, Q.-L. (2010). Preparation and sustained-release property of triblock copolymer/calcium phosphate nanocomposite as nanocarrier for hydrophobic drug. *Nanoscale Res. Lett.* 5, 781–785.
- Cazalbou, S., Combes, C., Eichert, D., Rey, C., and Glimcher, M.J. (2004). Poorly crystalline apatites: evolution and maturation in vitro and in vivo. *J. Bone Miner. Metab.* 22, 310–317.
- Chai, Y., Jiang, X., Ito, Y., Bringas, P., Han, J., Rowitch, D.H., Soriano, P., McMahon, A.P., and Sucov, H.M. (2000). Fate of the mammalian cranial neural crest during tooth and mandibular morphogenesis. *Dev. Camb. Engl.* 127, 1671–1679.
- Chen, L.S., Couwenhoven, R.I., Hsu, D., Luo, W., and Snead, M.L. (1992). Maintenance of amelogenin gene expression by transformed epithelial cells of mouse enamel organ. *Arch. Oral Biol.* 37, 771–778.
- Combes, C., and Rey, C. (2010). Amorphous calcium phosphates: synthesis, properties and uses in biomaterials. *Acta Biomater.* 6, 3362–3378.
- Coyac, B.R., Chicatun, F., Hoac, B., Nelea, V., Chaussain, C., Nazhat, S.N., and McKee, M.D. (2013). Mineralization of dense collagen hydrogel scaffolds by human pulp cells. *J. Dent. Res.* 92, 648–654.
- Czajka-Jakubowska, A.E., Liu, J., Chang, S.-R., and Clarkson, B.H. (2009). The effect of the surface characteristics of various substrates on fluorapatite crystal growth, alignment, and spatial orientation. *Med. Sci. Monit. Int. Med. J. Exp. Clin. Res.* 15, MT84–MT88.
- Delak, K., Harcup, C., Lakshminarayanan, R., Sun, Z., Fan, Y., Moradian-Oldak, J., and Evans, J.S. (2009). The tooth enamel protein, porcine amelogenin, is an intrinsically disordered protein with an extended molecular configuration in the monomeric form. *Biochemistry (Mosc.)* 48, 2272–2281.
- Delgado, S., Vidal, N., Veron, G., and Sire, J.-Y. (2008). Amelogenin, the major protein of tooth enamel: a new phylogenetic marker for ordinal mammal relationships. *Mol. Phylogenet. Evol.* 47, 865–869.
- Denbesten, P., and Li, W. (2011). Chronic fluoride toxicity: dental fluorosis. *Monogr. Oral Sci.* 22, 81–96.
- Deutsch, D., Leiser, Y., Shay, B., Fermon, E., Taylor, A., Rosenfeld, E., Dafni, L., Charuvi, K., Cohen, Y., Haze, A., et al. (2002). The human tuftelin gene and the expression of tuftelin in mineralizing and nonmineralizing tissues. *Connect. Tissue Res.* 43, 425–434.
- Du, C., Falini, G., Fermani, S., Abbott, C., and Moradian-Oldak, J. (2005). Supramolecular assembly of amelogenin nanospheres into birefringent microribbons. *Science* 307, 1450–1454.
- Elhechmi, I., Braga, J., Dasgupta, G., and Gharbi, T. (2013). Accelerated measurement of perikymata by an optical instrument. *Biomed. Opt. Express* 4, 2124–2137.

- Fagrell, T.G., Dietz, W., Jälevik, B., and Norén, J.G. (2010). Chemical, mechanical and morphological properties of hypomineralized enamel of permanent first molars. *Acta Odontol. Scand.* *68*, 215–222.
- Fan, Y., Sun, Z., and Moradian-Oldak, J. (2009). Controlled remineralization of enamel in the presence of amelogenin and fluoride. *Biomaterials* *30*, 478–483.
- Fan, Y., Nelson, J.R., Alvarez, J.R., Hagan, J., Berrier, A., and Xu, X. (2011). Amelogenin-assisted ex vivo remineralization of human enamel: Effects of supersaturation degree and fluoride concentration. *Acta Biomater.* *7*, 2293–2302.
- Fincham, A.G., and Moradian-Oldak, J. (1993). Amelogenin post-translational modifications: carboxy-terminal processing and the phosphorylation of bovine and porcine “TRAP” and “LRAP” amelogenins. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *197*, 248–255.
- Fincham, A.G., Belcourt, A.B., Termine, J.D., Butler, W.T., and Cothran, W.C. (1981). Dental enamel matrix: sequences of two amelogenin polypeptides. *Biosci. Rep.* *1*, 771–778.
- Fincham, A.G., Belcourt, A.B., Termine, J.D., Butler, W.T., and Cothran, W.C. (1983). Amelogenins. Sequence homologies in enamel-matrix proteins from three mammalian species. *Biochem. J.* *211*, 149–154.
- Fincham, A.G., Moradian-Oldak, J., Diekwisch, T.G., Lyaruu, D.M., Wright, J.T., Bringas, P., and Slavkin, H.C. (1995). Evidence for amelogenin “nanospheres” as functional components of secretory-stage enamel matrix. *J. Struct. Biol.* *115*, 50–59.
- Fincham, A.G., Moradian-Oldak, J., and Simmer, J.P. (1999). The structural biology of the developing dental enamel matrix. *J. Struct. Biol.* *126*, 270–299.
- Fowler, C.E., Beniash, E., Yamakoshi, Y., Simmer, J.P., and Margolis, H.C. (2006). Co-operative mineralization and protein self-assembly in amelogenesis: silica mineralization and assembly of recombinant amelogenins in vitro. *Eur. J. Oral Sci.* *114 Suppl 1*, 297–303; discussion 327–329, 382.
- Frazier, P.D. (1968). Adult human enamel: an electron microscopic study of crystallite size and morphology. *J. Ultrastruct. Res.* *22*, 1–11.
- Gadaleta, S.J., Paschalis, E.P., Betts, F., Mendelsohn, R., and Boskey, A.L. (1996). Fourier transform infrared spectroscopy of the solution-mediated conversion of amorphous calcium phosphate to hydroxyapatite: new correlations between X-ray diffraction and infrared data. *Calcif. Tissue Int.* *58*, 9–16.
- Gajjaraman, S., Narayanan, K., Hao, J., Qin, C., and George, A. (2007). Matrix macromolecules in hard tissues control the nucleation and hierarchical assembly of hydroxyapatite. *J. Biol. Chem.* *282*, 1193–1204.
- Gericke, A., Qin, C., Spevak, L., Fujimoto, Y., Butler, W.T., Sørensen, E.S., and Boskey, A.L. (2005). Importance of phosphorylation for osteopontin regulation of biomineralization. *Calcif. Tissue Int.* *77*, 45–54.
- Gibson, C.W., Golub, E., Ding, W.D., Shimokawa, H., Young, M., Termine, J., and Rosenbloom, J. (1991). Identification of the leucine-rich amelogenin peptide (LRAP) as the translation product of an alternatively spliced transcript. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *174*, 1306–1312.

Gibson, C.W., Yuan, Z.A., Hall, B., Longenecker, G., Chen, E., Thyagarajan, T., Sreenath, T., Wright, J.T., Decker, S., Piddington, R., et al. (2001). Amelogenin-deficient mice display an amelogenesis imperfecta phenotype. *J. Biol. Chem.* 276, 31871–31875.

Gibson, C.W., Kulkarni, A.B., and Wright, J.T. (2005). The use of animal models to explore amelogenin variants in amelogenesis imperfecta. *Cells Tissues Organs* 181, 196–201.

Gibson, C.W., Li, Y., Daly, B., Suggs, C., Yuan, Z., Fong, H., Simmons, D., Aragon, M., Kulkarni, A.B., and Wright, J.T. (2009). The leucine-rich amelogenin peptide alters the amelogenin null enamel phenotype. *Cells Tissues Organs* 189, 169–174.

Goldberg, M., and Gaucher, C. (2011). *Embryologie de la dent*. EMC.

Gruenbaum-Cohen, Y., Tucker, A.S., Haze, A., Shilo, D., Taylor, A.L., Shay, B., Sharpe, P.T., Mitsiadis, T.A., Ornoy, A., Blumenfeld, A., et al. (2009). 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.* 312B, 445–457.

Habelitz, S., DenBesten, P.K., Marshall, S.J., Marshall, G.W., and Li, W. (2006). Self-assembly and effect on crystal growth of the leucine-rich amelogenin peptide. *Eur. J. Oral Sci.* 114 Suppl 1, 315–319; discussion 327–329, 382.

Habraken, W.J.E.M., Tao, J., Brylka, L.J., Friedrich, H., Bertinetti, L., Schenk, A.S., Verch, A., Dmitrovic, V., Bomans, P.H.H., Frederik, P.M., et al. (2013). Ion-association complexes unite classical and non-classical theories for the biomimetic nucleation of calcium phosphate. *Nat. Commun.* 4, 1507.

Hatakeyama, J., Sreenath, T., Hatakeyama, Y., Thyagarajan, T., Shum, L., Gibson, C.W., Wright, J.T., and Kulkarni, A.B. (2003). The receptor activator of nuclear factor-kappa B ligand-mediated osteoclastogenic pathway is elevated in amelogenin-null mice. *J. Biol. Chem.* 278, 35743–35748.

Hatakeyama, J., Philp, D., Hatakeyama, Y., Haruyama, N., Shum, L., Aragon, M.A., Yuan, Z., Gibson, C.W., Sreenath, T., Kleinman, H.K., et al. (2006). Amelogenin-mediated regulation of osteoclastogenesis, and periodontal cell proliferation and migration. *J. Dent. Res.* 85, 144–149.

He, L.H., and Swain, M.V. (2008). Understanding the mechanical behaviour of human enamel from its structural and compositional characteristics. *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.* 1, 18–29.

Hu, C.C., Fukae, M., Uchida, T., Qian, Q., Zhang, C.H., Ryu, O.H., Tanabe, T., Yamakoshi, Y., Murakami, C., Dohi, N., et al. (1997). Sheathlin: cloning, cDNA/polypeptide sequences, and immunolocalization of porcine enamel sheath proteins. *J. Dent. Res.* 76, 648–657.

Hu, J.C.-C., Hu, Y., Smith, C.E., McKee, M.D., Wright, J.T., Yamakoshi, Y., Papagerakis, P., Hunter, G.K., Feng, J.Q., Yamakoshi, F., et al. (2008). Enamel defects and ameloblast-specific expression in Enam knock-out/lacZ knock-in mice. *J. Biol. Chem.* 283, 10858–10871.

Iacob, S., and Veis, A. (2008). Identification of the functional activity of the [A-4] amelogenin gene splice product in newborn mouse ameloblasts. *Bone* 42, 1072–1079.

Jeong, C.C., Zhou, X.D., Li, J.Y., Li, W., and Zhang, L.L. (2011). Possibilities and potential roles of the functional peptides based on enamel matrix proteins in promoting the remineralization of initial enamel caries. *Med. Hypotheses* 76, 391–394.

- Jedeon, K., Marciano, C., Loiodice, S., Boudalia, S., Canivenc Lavier, M.-C., Berdal, A., and Babajko, S. (2014). Enamel hypomineralization due to endocrine disruptors. *Connect. Tissue Res.* *55 Suppl 1*, 43–47.
- Jegat, N., Septier, D., Veis, A., Poliard, A., and Goldberg, M. (2007). Short-term effects of amelogenin gene splice products A+4 and A-4 implanted in the exposed rat molar pulp. *Head Face Med.* *3*, 40.
- Jernvall, J., Kettunen, P., Karavanova, I., Martin, L.B., and Thesleff, I. (1994). Evidence for the role of the enamel knot as a control center in mammalian tooth cusp formation: non-dividing cells express growth stimulating Fgf-4 gene. *Int. J. Dev. Biol.* *38*, 463–469.
- Jernvall, J., Aberg, T., Kettunen, P., Keränen, S., and Thesleff, I. (1998). The life history of an embryonic signaling center: BMP-4 induces p21 and is associated with apoptosis in the mouse tooth enamel knot. *Dev. Camb. Engl.* *125*, 161–169.
- Jiang, H., and Liu, X.-Y. (2004). Principles of mimicking and engineering the self-organized structure of hard tissues. *J. Biol. Chem.* *279*, 41286–41293.
- Jussila, M., and Thesleff, I. (2012). Signaling networks regulating tooth organogenesis and regeneration, and the specification of dental mesenchymal and epithelial cell lineages. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* *4*, a008425.
- Kawasaki, K., and Weiss, K.M. (2003). Mineralized tissue and vertebrate evolution: the secretory calcium-binding phosphoprotein gene cluster. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *100*, 4060–4065.
- Kerebel, B., Daculsi, G., and Kerebel, L.M. (1979). Ultrastructural studies of enamel crystallites. *J. Dent. Res.* *58*, 844–851.
- Kirkham, J., Firth, A., Vernals, D., Boden, N., Robinson, C., Shore, R.C., Brookes, S.J., and Aggeli, A. (2007). Self-assembling peptide scaffolds promote enamel remineralization. *J. Dent. Res.* *86*, 426–430.
- Koutsopoulos, S. (2002). Synthesis and characterization of hydroxyapatite crystals: a review study on the analytical methods. *J. Biomed. Mater. Res.* *62*, 600–612.
- Kwak, S.-Y., Wiedemann-Bidlack, F.B., Beniash, E., Yamakoshi, Y., Simmer, J.P., Litman, A., and Margolis, H.C. (2009). Role of 20-kDa amelogenin (P148) phosphorylation in calcium phosphate formation in vitro. *J. Biol. Chem.* *284*, 18972–18979.
- Lacruz, R.S., Hilvo, M., Kurtz, I., and Paine, M.L. (2010). A survey of carbonic anhydrase mRNA expression in enamel cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *393*, 883–887.
- Le, T.Q., Gochin, M., Featherstone, J.D.B., Li, W., and DenBesten, P.K. (2006). Comparative calcium binding of leucine-rich amelogenin peptide and full-length amelogenin. *Eur. J. Oral Sci.* *114 Suppl 1*, 320–326; discussion 327–329, 382.
- Le, T.Q., Zhang, Y., Li, W., and Denbesten, P.K. (2007). The effect of LRAP on enamel organ epithelial cell differentiation. *J. Dent. Res.* *86*, 1095–1099.
- Lesot, H., and Brook, A.H. (2009). Epithelial histogenesis during tooth development. *Arch. Oral Biol.* *54 Suppl 1*, S25–S33.

- Li, Y., Yuan, Z.-A., Aragon, M.A., Kulkarni, A.B., and Gibson, C.W. (2006). Comparison of body weight and gene expression in amelogenin null and wild-type mice. *Eur. J. Oral Sci.* *114 Suppl 1*, 190–193; discussion 201–202, 381.
- Li, Y., Suggs, C., Wright, J.T., Yuan, Z., Aragon, M., Fong, H., Simmons, D., Daly, B., Golub, E.E., Harrison, G., et al. (2008). Partial rescue of the amelogenin null dental enamel phenotype. *J. Biol. Chem.* *283*, 15056–15062.
- Lin, H.M., Nakamura, H., Noda, T., and Ozawa, H. (1994). Localization of H(+)-ATPase and carbonic anhydrase II in ameloblasts at maturation. *Calcif. Tissue Int.* *55*, 38–45.
- Mahoney, E.K., Rohanizadeh, R., Ismail, F.S.M., Kilpatrick, N.M., and Swain, M.V. (2004). Mechanical properties and microstructure of hypomineralised enamel of permanent teeth. *Biomaterials* *25*, 5091–5100.
- Mao, Z., Shay, B., Hekmati, M., Fermon, E., Taylor, A., Dafni, L., Heikinheimo, K., Lustmann, J., Fisher, L.W., Young, M.F., et al. (2001). The human tuftelin gene: cloning and characterization. *Gene* *279*, 181–196.
- Margolis, H. (2011). Amelogenin. *Eur. J. Oral Sci.* *119 Suppl 1*, 88–94.
- Margolis, H.C., Beniash, E., and Fowler, C.E. (2006). Role of macromolecular assembly of enamel matrix proteins in enamel formation. *J. Dent. Res.* *85*, 775–793.
- Margolis, H.C., Kwak, S.-Y., and Yamazaki, H. (2014). Role of mineralization inhibitors in the regulation of hard tissue biomineralization: relevance to initial enamel formation and maturation. *Front. Physiol.* *5*, 339.
- McCauley, L.K., and Somerman, M.J. (2012). Mineralized tissues in oral and craniofacial science: biological principles and clinical correlates (Wiley-Blackwell).
- Miletich, I., and Sharpe, P.T. (2004). Neural crest contribution to mammalian tooth formation. *Birth Defects Res. Part C Embryo Today Rev.* *72*, 200–212.
- Moffatt, P., Wazen, R.M., Santos Neves, J. Dos, and Nanci, A. (2014). Characterisation of secretory calcium-binding phosphoprotein-proline-glutamine-rich 1: a novel basal lamina component expressed at cell-tooth interfaces. *Cell Tissue Res.* *358*, 843–855.
- Moradian-Oldak, J. (2001). Amelogenins: assembly, processing and control of crystal morphology. *Matrix Biol. J. Int. Soc. Matrix Biol.* *20*, 293–305.
- Moradian-Oldak, J. (2012a). Protein-mediated enamel mineralization. *Front. Biosci. Landmark Ed.* *17*, 1996–2023.
- Moradian-Oldak, J. (2012b). Protein-mediated enamel mineralization. *Front. Biosci. Landmark Ed.* *17*, 1996–2023.
- Moradian-Oldak, J., and Goldberg, M. (2005). Amelogenin supra-molecular assembly in vitro compared with the architecture of the forming enamel matrix. *Cells Tissues Organs* *181*, 202–218.
- Moradian-Oldak, J., Tan, J., and Fincham, A.G. (1998). Interaction of amelogenin with hydroxyapatite crystals: an adherence effect through amelogenin molecular self-association. *Biopolymers* *46*, 225–238.

- Moradian-Oldak, J., Bouropoulos, N., Wang, L., and Gharakhanian, N. (2002). Analysis of self-assembly and apatite binding properties of amelogenin proteins lacking the hydrophilic C-terminal. *Matrix Biol. J. Int. Soc. Matrix Biol.* *21*, 197–205.
- Moradian-Oldak, J., Du, C., and Falini, G. (2006). On the formation of amelogenin microribbons. *Eur. J. Oral Sci.* *114 Suppl 1*, 289–296; discussion 327–329, 382.
- Nagano, T., Kakegawa, A., Yamakoshi, Y., Tsuchiya, S., Hu, J.C.-C., Gomi, K., Arai, T., Bartlett, J.D., and Simmer, J.P. (2009). Mmp-20 and Klk4 cleavage site preferences for amelogenin sequences. *J. Dent. Res.* *88*, 823–828.
- Nakata, A., Kameda, T., Nagai, H., Ikegami, K., Duan, Y., Terada, K., and Sugiyama, T. (2003). Establishment and characterization of a spontaneously immortalized mouse ameloblast-lineage cell line. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *308*, 834–839.
- Nanci, A. (2003). *Ten Cate's Oral Histology: Development, Structure and Function* (Mosby).
- Nebgen, D.R., Inoue, H., Sabsay, B., Wei, K., Ho, C.S., and Veis, A. (1999). Identification of the chondrogenic-inducing activity from bovine dentin (bCIA) as a low-molecular-mass amelogenin polypeptide. *J. Dent. Res.* *78*, 1484–1494.
- Le Norcy, E., Kwak, S.-Y., Wiedemann-Bidlack, F.B., Beniash, E., Yamakoshi, Y., Simmer, J.P., and Margolis, H.C. (2011a). Potential role of the amelogenin N-terminus in the regulation of calcium phosphate formation in vitro. *Cells Tissues Organs* *194*, 188–193.
- Le Norcy, E., Kwak, S.-Y., Wiedemann-Bidlack, F.B., Beniash, E., Yamakoshi, Y., Simmer, J.P., and Margolis, H.C. (2011b). Leucine-rich amelogenin peptides regulate mineralization in vitro. *J. Dent. Res.* *90*, 1091–1097.
- Paine, M.L., and Snead, M.L. (1997). Protein interactions during assembly of the enamel organic extracellular matrix. *J. Bone Miner. Res. Off. J. Am. Soc. Bone Miner. Res.* *12*, 221–227.
- Paine, C.T., Paine, M.L., Luo, W., Okamoto, C.T., Lyngstadaas, S.P., and Snead, M.L. (2000). A tuftelin-interacting protein (TIP39) localizes to the apical secretory pole of mouse ameloblasts. *J. Biol. Chem.* *275*, 22284–22292.
- Paine, M.L., Luo, W., Zhu, D.-H., Bringas, P., and Snead, M.L. (2003a). Functional domains for amelogenin revealed by compound genetic defects. *J. Bone Miner. Res. Off. J. Am. Soc. Bone Miner. Res.* *18*, 466–472.
- Paine, M.L., Wang, H.-J., and Snead, M.L. (2003b). Amelogenin self-assembly and the role of the proline located within the carboxyl-teleopeptide. *Connect. Tissue Res.* *44 Suppl 1*, 52–57.
- Petta, V., Moradian-Oldak, J., Yannopoulos, S.N., and Bouropoulos, N. (2006). Dynamic light scattering study of an amelogenin gel-like matrix in vitro. *Eur. J. Oral Sci.* *114 Suppl 1*, 308–314; discussion 327–329, 382.
- Piette, E., and Goldberg, M. (2001). *La dent normale et pathologique* (DeBoeck).
- Poole, D.F., and Brooks, A.W. (1961). The arrangement of crystallites in enamel prisms. *Arch. Oral Biol.* *5*, 14–26.
- Popowics, T., Foster, B.L., Swanson, E.C., Fong, H., and Somerman, M.J. (2005). Defining the roots of cementum formation. *Cells Tissues Organs* *181*, 248–257.

- Pugach, M.K., Li, Y., Suggs, C., Wright, J.T., Aragon, M.A., Yuan, Z.A., Simmons, D., Kulkarni, A.B., and Gibson, C.W. (2010). The amelogenin C-terminus is required for enamel development. *J. Dent. Res.* 89, 165–169.
- Ravindranath, R.M.H., Devarajan, A., and Bringas, P. (2007). Enamel formation in vitro in mouse molar explants exposed to amelogenin polypeptides ATMP and LRAP on enamel development. *Arch. Oral Biol.* 52, 1161–1171.
- Risnes, S. (1998). Growth tracks in dental enamel. *J. Hum. Evol.* 35, 331–350.
- Robinson, C. (2007). Self-oriented assembly of nano-apatite particles: a subunit mechanism for building biological mineral crystals. *J. Dent. Res.* 86, 677–679.
- Rothová, M., Feng, J., Sharpe, P.T., Peterková, R., and Tucker, A.S. (2011). Contribution of mesoderm to the developing dental papilla. *Int. J. Dev. Biol.* 55, 59–64.
- Ruan, Q., and Moradian-Oldak, J. (2014). Development of amelogenin-chitosan hydrogel for in vitro enamel regrowth with a dense interface. *J. Vis. Exp. JoVE*.
- Ruan, Q., and Moradian-Oldak, J. (2015). Amelogenin and Enamel Biomimetics. *J. Mater. Chem. B Mater. Biol. Med.* 3, 3112–3129.
- Ruch, J.V. (1998). Odontoblast commitment and differentiation. *Biochem. Cell Biol. Biochim. Biol. Cell.* 76, 923–938.
- Ryu, O.H., Hu, C.C., and Simmer, J.P. (1996). Comparative HPLC, SDS-PAGE, and immunoblot analyses of dental enamel proteins. *Adv. Dent. Res.* 10, 150–158.
- Sarkar, J., Simanian, E.J., Tuggy, S.Y., Bartlett, J.D., Snead, M.L., Sugiyama, T., and Paine, M.L. (2014). Comparison of two mouse ameloblast-like cell lines for enamel-specific gene expression. *Front. Physiol.* 5, 277.
- Shafiei, F., Hossein, B.G., Farajollahi, M.M., Fathollah, M., Marjan, B., and Tahereh, J.K. (2015). Leucine-rich amelogenin peptide (LRAP) as a surface primer for biomimetic remineralization of superficial enamel defects: An in vitro study. *Scanning* 37, 179–185.
- Shaw, W.J., and Ferris, K. (2008). Structure, orientation, and dynamics of the C-terminal hexapeptide of LRAP determined using solid-state NMR. *J. Phys. Chem. B* 112, 16975–16981.
- Shaw, W.J., Campbell, A.A., Paine, M.L., and Snead, M.L. (2004). The COOH terminus of the amelogenin, LRAP, is oriented next to the hydroxyapatite surface. *J. Biol. Chem.* 279, 40263–40266.
- Simmer, J.P., Richardson, A.S., Hu, Y.-Y., Smith, C.E., and Ching-Chun Hu, J. (2012). A post-classical theory of enamel biomineralization... and why we need one. *Int. J. Oral Sci.* 4, 129–134.
- Sire, J.-Y., Delgado, S., Fromentin, D., and Girondot, M. (2005). Amelogenin: lessons from evolution. *Arch. Oral Biol.* 50, 205–212.
- Skobe, Z., and Stern, S. (1980). The pathway of enamel rods at the base of cusps of human teeth. *J. Dent. Res.* 59, 1026–1032.
- Slavkin, H.C., Brownell, A.G., Bringas, P., MacDougall, M., and Bessem, C. (1983). Basal lamina persistence during epithelial-mesenchymal interactions in murine tooth development in vitro. *J. Craniofac. Genet. Dev. Biol.* 3, 387–407.

- Somogyi-Ganss, E., Nakayama, Y., Iwasaki, K., Nakano, Y., Stolf, D., McKee, M.D., and Ganss, B. (2012). Comparative temporospatial expression profiling of murine amelotin protein during amelogenesis. *Cells Tissues Organs* 195, 535–549.
- Stahl, J., Nakano, Y., Kim, S.-O., Gibson, C.W., Le, T., and DenBesten, P. (2013). Leucine rich amelogenin peptide alters ameloblast differentiation in vivo. *Matrix Biol. J. Int. Soc. Matrix Biol.* 32, 432–442.
- Stahl, J., Nakano, Y., Horst, J., Zhu, L., Le, M., Zhang, Y., Liu, H., Li, W., and Besten, P.K. Den (2015). Exon4 amelogenin transcripts in enamel biomineralization. *J. Dent. Res.* 94, 836–842.
- Tanimoto, K., Le, T., Zhu, L., Chen, J., Featherstone, J.D.B., Li, W., and DenBesten, P. (2008). Effects of fluoride on the interactions between amelogenin and apatite crystals. *J. Dent. Res.* 87, 39–44.
- Tarasevich, B.J., Howard, C.J., Larson, J.L., Snead, M.L., Simmer, J.P., Paine, M., and Shaw, W.J. (2007). The nucleation and growth of calcium phosphate by amelogenin. *J. Cryst. Growth* 304, 407–415.
- Thesleff, I., and Sharpe, P. (1997). Signalling networks regulating dental development. *Mech. Dev.* 67, 111–123.
- Tompkins, K., and Veis, A. (2002). 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.* 43, 224–231.
- Tompkins, K., Alvares, K., George, A., and Veis, A. (2005). Two related low molecular mass polypeptide isoforms of amelogenin have distinct activities in mouse tooth germ differentiation in vitro. *J. Bone Miner. Res. Off. J. Am. Soc. Bone Miner. Res.* 20, 341–349.
- Tompkins, K., George, A., and Veis, A. (2006). Characterization of a mouse amelogenin [A-4]/M59 cell surface receptor. *Bone* 38, 172–180.
- Tummers, M., and Thesleff, I. (2009). The importance of signal pathway modulation in all aspects of tooth development. *J. Exp. Zool. B Mol. Dev. Evol.* 312B, 309–319.
- Uchida, T., Murakami, C., Dohi, N., Wakida, K., Satoda, T., and Takahashi, O. (1997). Synthesis, secretion, degradation, and fate of ameloblastin during the matrix formation stage of the rat incisor as shown by immunocytochemistry and immunochemistry using region-specific antibodies. *J. Histochem. Cytochem. Off. J. Histochem. Soc.* 45, 1329–1340.
- Veis, A. (2003). Amelogenin gene splice products: potential signaling molecules. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* 60, 38–55.
- Wang, L., Guan, X., Du, C., Moradian-Oldak, J., and Nancollas, G.H. (2007). Amelogenin Promotes the Formation of Elongated Apatite Microstructures in a Controlled Crystallization System. *J. Phys. Chem. C Nanomater. Interfaces* 111, 6398–6404.
- Warotayanont, R., Zhu, D., Snead, M.L., and Zhou, Y. (2008). Leucine-rich amelogenin peptide induces osteogenesis in mouse embryonic stem cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 367, 1–6.
- Warotayanont, R., Frenkel, B., Snead, M.L., and Zhou, Y. (2009). Leucine-rich amelogenin peptide induces osteogenesis by activation of the Wnt pathway. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 387, 558–563.

- Warshawsky, H. (1971). A light and electron microscopic study of the nearly mature enamel of rat incisors. *Anat. Rec.* **169**, 559–583.
- Warshawsky, H., and Smith, C.E. (1971). A three-dimensional reconstruction of the rods in rat maxillary incisor enamel. *Anat. Rec.* **169**, 585–591.
- Wen, X., Cawthorn, W.P., MacDougald, O.A., Stupp, S.I., Snead, M.L., and Zhou, Y. (2011). The influence of Leucine-rich amelogenin peptide on MSC fate by inducing Wnt10b expression. *Biomaterials* **32**, 6478–6486.
- White, S.N., Luo, W., Paine, M.L., Fong, H., Sarikaya, M., and Snead, M.L. (2001). Biological organization of hydroxyapatite crystallites into a fibrous continuum toughens and controls anisotropy in human enamel. *J. Dent. Res.* **80**, 321–326.
- Wiedemann-Bidlack, F.B., Beniash, E., Yamakoshi, Y., Simmer, J.P., and Margolis, H.C. (2007). pH triggered self-assembly of native and recombinant amelogenins under physiological pH and temperature in vitro. *J. Struct. Biol.* **160**, 57–69.
- Wiedemann-Bidlack, F.B., Kwak, S.-Y., Beniash, E., Yamakoshi, Y., Simmer, J.P., and Margolis, H.C. (2011). Effects of phosphorylation on the self-assembly of native full-length porcine amelogenin and its regulation of calcium phosphate formation in vitro. *J. Struct. Biol.* **173**, 250–260.
- Willmott, N.S., Bryan, R. a. E., and Duggal, M.S. (2008). Molar-incisor-hypomineralisation: a literature review. *Eur. Arch. Paediatr. Dent. Off. J. Eur. Acad. Paediatr. Dent.* **9**, 172–179.
- Wright, J.T., Carrion, I.A., and Morris, C. (2015). The molecular basis of hereditary enamel defects in humans. *J. Dent. Res.* **94**, 52–61.
- Xie, Z., Kilpatrick, N.M., Swain, M.V., Munroe, P.R., and Hoffman, M. (2008). Transmission electron microscope characterisation of molar-incisor-hypomineralisation. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **19**, 3187–3192.
- Xu, H.H., Smith, D.T., Jahanmir, S., Romberg, E., Kelly, J.R., Thompson, V.P., and Rekow, E.D. (1998). Indentation damage and mechanical properties of human enamel and dentin. *J. Dent. Res.* **77**, 472–480.
- Xu, L., Harada, H., Yokohama-Tamaki, T., Matsumoto, S., Tanaka, J., and Taniguchi, A. (2006). Reuptake of extracellular amelogenin by dental epithelial cells results in increased levels of amelogenin mRNA through enhanced mRNA stabilization. *J. Biol. Chem.* **281**, 2257–2262.
- Xu, L., Harada, H., and Taniguchi, A. (2008). The effects of LAMP1 and LAMP3 on M180 amelogenin uptake, localization and amelogenin mRNA induction by amelogenin protein. *J. Biochem. (Tokyo)* **144**, 531–537.
- Yamakoshi, Y. (2011). Porcine Amelogenin : Alternative Splicing, Proteolytic Processing, Protein - Protein Interactions, and Possible Functions. *J. Oral Biosci. JAOB Jpn. Assoc. Oral Biol.* **53**, 275–283.
- Yang, X., Wang, L., Qin, Y., Sun, Z., Henneman, Z.J., Moradian-Oldak, J., and Nancollas, G.H. (2010). How amelogenin orchestrates the organization of hierarchical elongated microstructures of apatite. *J. Phys. Chem. B* **114**, 2293–2300.
- Ye, L., Le, T.Q., Zhu, L., Butcher, K., Schneider, R.A., Li, W., and Besten, P.K.D. (2006). Amelogenins in human developing and mature dental pulp. *J. Dent. Res.* **85**, 814–818.

- Yin, Y., Yun, S., Fang, J., and Chen, H. (2009). Chemical regeneration of human tooth enamel under near-physiological conditions. *Chem. Commun. Camb. Engl.* 5892–5894.
- Yoshizaki, K., and Yamada, Y. (2013). Gene evolution and functions of extracellular matrix proteins in teeth. *Orthod. Waves Engl. Ed* 72, 1–10.
- Yuan, Z.A., Collier, P.M., Rosenbloom, J., and Gibson, C.W. (1996). Analysis of amelogenin mRNA during bovine tooth development. *Arch. Oral Biol.* 41, 205–213.
- Zhang, Y.D., Chen, Z., Song, Y.Q., Liu, C., and Chen, Y.P. (2005). Making a tooth: growth factors, transcription factors, and stem cells. *Cell Res.* 15, 301–316.
- Zhu, L., Tanimoto, K., Le, T., DenBesten, P.K., and Li, W. (2009). Functional roles of prolines at amelogenin C terminal during tooth enamel formation. *Cells Tissues Organs* 189, 203–206.

Communications orales et affichées

- 2015 Le Norcy E**, Sadoine Jeremy, Snead Malcom, Margolis Henry, Chaussain Catherine, Poliard Anne
Effect of the Leucine Rich Amelogenin Peptide on enamel structure and mineralization. Congrès des Journées Française de la Biologie des Tissus Minéralisés. (Clermont-Ferrand). **Communication affichée avec présentation orale flash**
- 2014 Le Norcy E**, Ribes Sandy, Mouton Ludovic, Snead Malcom, Margolis Henry, Chaussain Catherine, Poliard Anne
Effet du Leucine Rich Amelogenin Peptide sur la minéralisation et la structure de l'émail. Congrès des Journées Française de la Biologie des Tissus Minéralisés. (Limoges). **Communication affichée avec présentation orale flash (prix de la présentation)**
- 2012 Le Norcy E**
Nouvelles approches pour la régénération de l'émail.
Congrès des Journées de l'Orthodontie. (Paris). **Communication orale**
- 2011 Le Norcy, E**, Kwak, S. Y, Yamakoshi, Y, Simmer, J. P. and Margolis, H. C.
Effect of phosphorylation on the interaction of calcium with Leucine-rich amelogenin peptide. Enamel VIII conference. (Utica, Illinois, USA). **Communication orale**
- 2010 Le Norcy E**, Kwak SY, Wiedemann-Bidlack FB, Beniash E, Yamakoshi Y, Simmer JP, and Margolis HC
Self-assembly of leucine-rich amelogenin peptides as a function of pH. Congrès de l'International Association for Dental Research (IADR). (Barcelone, Espagne). **Communication orale**
- 2010 Le Norcy E**, Kwak SY, Wiedemann-Bidlack FB, Beniash E, Yamakoshi Y, Simmer JP, and Margolis HC

Effect of LRAP on spontaneous calcium phosphate formation in vitro. Congrès de l'International Association for Dental Research (IADR). (Barcelone, Espagne).

Communication orale

2010 Le Norcy E, Kwak SY, Wiedemann-Bidlack FB, Beniash E, Yamakoshi Y, Simmer JP, and Margolis HC

Effect of LRAP on spontaneous calcium phosphate formation in vitro. Forsyth Retreat (Massachusetts, Etats Unis). **Communication affichée**

Annexe

To be submitted

Effect of the Leucine Rich Amelogenine Peptide on enamel mineralization in vitro

Elvire Le Norcy^{1,2}, Julie Lesieur¹, Jeremy Sadoine¹, Henry Margolis³, Malcolm Snead⁴,
Toshihiro Sugiyama⁵, Ludovic Mouton⁶, Catherine Chaussain^{1,2}, Anne Poliard¹

¹ EA2496 Faculté de Chirurgie Dentaire, Université Paris Descartes, 1 rue Maurice Arnoux, 92120 Montrouge, France

² Hopital Bretonneau, Service d'Odontologie, 23 rue Joseph de Maistre, 75018 Paris, France

³ Applied Oral Science Department, Forsyth Institute, 245 First Street, Cambridge MA 02142, Etats Unis

⁴ Center for Craniofacial Molecular, Biology, Division of Biomedical Sciences, Ostrow School of Dentistry, University of Southern California, 2250 Alcazar Street, Los Angeles CA 90033, Etats Unis

⁵ Department of Biochemistry, Akita University School of Medicine, Hondo 1-1-1, Akita 010-8543, Japon

⁶ Université Paris 7 Diderot – ITODYS, 15 rue Jean-Antoine de Baïf, 75205 PARIS cedex 13, France

Abstract

Dental enamel, the outer calcified tissue layer covering the crown of the tooth, is the most mineralized tissue of the human body. Enamel is synthesized by the ameloblasts during the course of tooth development but this cell population degenerates and totally regresses when the tooth becomes functional. The mature enamel is therefore completely devoid of cell and protein content. The Leucine Rich Amelogenin Peptide (LRAP) is a product of alternative splicing of the amelogenin gene, the main protein synthesized by the ameloblast. LRAP is a short peptide (56kDa) composed of the active N and C-terminal sequence of the amelogenin protein. This peptide has shown *in vitro* signaling properties towards odontoblast and ameloblast differentiation (Le et al., 2007, Tomkins et al., 2005). We have previously shown that the different forms of LRAP (with or without the phosphate group on Serine 16) exhibited a regulating effect on HAP crystal formation. The phosphorylated form (LRAP+P) transiently stabilized amorphous calcium phosphate whereas the non-phosphorylated form (LRAP-P) exhibited a morphogenic effect on crystal growth (Le Norcy et al. 2011). These different studies suggest that LRAP could be a potential candidate for the development of therapeutic strategies against enamel defects. The aim of this work is to evaluate the biological effects of the different forms of LRAP on ameloblast differentiation and enamel formation. To this end, we have exploited two experimental models: 1) differentiation of the ameloblastic cell lines LS8 and ALC in mineralizing conditions and 2) *ex vivo* cultures of mouse first molar germs withdrawn at postnatal day 1 (PD1) in standard and mineralizing media. Kinetic expression of the amelogenin gene is evaluated by qPCR, and mineralization by TEM, SAED, microCT and FE-SEM analysis. The presence of both forms of LRAP activates LS8 and ALC cells differentiation kinetics and leads to the formation of organized, elongated HAP crystals, mineral nucleation could also be observed in the ALC cells in the presence of LRAP(+P). In the germ culture model, LRAP(+P) up-regulates germ differentiation in the standard medium, while, in the mineralizing medium, it mediates an increase in the density and volume of mineral formed. This work aims to open new enamel tissue regeneration strategies in order to treat alteration in the enamel layer by decay (through LRAP(-P) treatment or genetic disorders such as *amelogenesis imperfecta* (with LRAP(+P))).

LE NORCY (Elvire). Rôle du Leucine Rich Amelogenin Peptide dans la formation et la minéralisation de l'émail. (S.l) : (S.n). 2015.f.162 : 30cm. Thèse de doctorat : Université Paris Descartes 2015.
Discipline : Développement

Résumé (français) :

L'émail dentaire est la couche de tissu externe calcifié recouvrant la couronne de la dent; c'est la structure la plus minéralisée du corps humain. L'émail est synthétisé par l'améloblaste au cours du développement de la dent, mais cette population cellulaire dégénère et régresse totalement lorsque la dent devient fonctionnelle. L'émail mature est donc complètement dépourvu de cellules et de contenu protéique. L'amélogénine, la principale protéine de l'émail a la capacité de s'assembler en structures très organisées de type nanochaînes qui vont guider et réguler les cristaux d'hydroxyapatite de l'émail en formation. Le Leucine Rich Amelogenin Peptide (LRAP) est un produit de l'épissage alternatif du gène de l'amélogénine ; c'est un peptide court (56kDa), composée des séquences actives et N- et C-terminales de la protéine d'amélogénine complète. Dans ce travail, nous avons cherché à comprendre le rôle de LRAP dans l'amélogénèse. Nous avons montré 1) que LRAP présentait les mêmes propriétés d'auto-assemblage que la forme complète d'amélogénine et ses produits de clivage ; 2) que LRAP possédait les mêmes propriétés de régulation des phosphates de calcium que la protéine complète ; et 3) que la conformation de la forme phosphorylée de LRAP était modifiée par une augmentation de la concentration de calcium dans le milieu environnant contrairement à la forme déphosphorylée de LRAP. Dans un second temps, nous avons étudié les propriétés de signalisation du peptide et confirmé nos résultats de minéralisation sur des modèles de culture de cellules de type améloblastique LS8 et ALC *in vitro* et sur un modèle de culture de germe de première molaire de souris *ex vivo*. Nous avons montré que la présence des deux formes de LRAP, active la cinétique de différenciation des cellules LS8 et ALC *in vitro* et favorise la formation de cristaux d'HAP organisés et allongés. Dans les germes en culture, la présence de LRAP(+P) dans un milieu minéralisant permet une augmentation de la densité et du volume de minéral formé alors que dans un milieu standard, il favorise la différenciation des germes. LRAP(-P) entraîne en revanche, la synthèse par les améloblastes sécréteurs de longs et fins cristaux d'HAP bien organisés. Ce travail pourrait ouvrir de nouvelles stratégies de régénération des tissus de l'émail afin de traiter des altérations de la couche d'émail résultant de lésions carieuses à l'aide du LRAP(-P) ou de troubles génétiques comme l'amélogénèse imparfaite en utilisant plutôt le LRAP(+P).

Mots clés (français) :

Amélogénine,
LRAP,
Hydroxyapatite,
Email,
Minéralisation,
Amélogénèse